

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 JUL 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er depot

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 300301

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

7 AOUT 2002

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0210063

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

- 7 AOUT 2002

Vos références pour ce dossier

(facultatif)

BFF 02/0329

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2, Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

DEMANDEUR

☐ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

Bio-Rad Pasteur

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Société Anonyme

Adresse

Rue

3, Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

Remplir impérativement la 2^{ème} page

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

R2

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

7 AOUT 2002

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0210063

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 5-10 W / 300301

Vos références pour ce dossier :
(facultatif)

BFF 02/0329

6 MANDATAIRE

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

CABINET LAVOIX

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

2 Place d'Estienne d'Orves

Code postal et ville

75441 PARIS CEDEX 09

N° de téléphone (facultatif)

01 53 20 14 20

N° de télécopie (facultatif)

01 48 74 54 56

Adresse électronique (facultatif)

brevets@cabinet-lavoix.com

7 INVENTEUR(S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui☒ Non

Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

8 RAPPORT DE RECHERCHE

(Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation))

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui☐ Non**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐

Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐

Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):

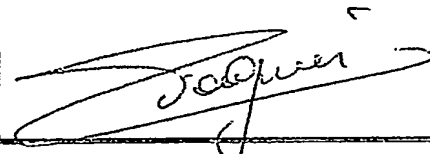
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

C. JACOBSON
n° 92.1119



VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI



L'invention concerne le domaine du diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

L'insuffisance cardiaque (Congestive heart failure) est un syndrome clinique fréquent, en particulier chez les personnes âgées. Il se présente habituellement sous la forme d'un déclenchement insidieux de symptômes non-spécifiques tels que la toux à l'effort, la fatigue, et l'apparition d'œdèmes périphériques. Le diagnostic repose classiquement sur l'étude de divers paramètres tels que les signes cliniques (classés en 4 stades: stades I à IV de la NYHA (c'est-à-dire de l'Association de Cardiologie de New York), l'échocardiographie, la scintigraphie, le test d'effort, etc..

En raison de la gravité de la maladie cardiaque et, aussi, des coûts élevés de sa prise en charge, un diagnostic précoce de ce syndrome est, évidemment, très hautement souhaitable : il contribuerait à éviter la progression rapide du syndrome vers l'insuffisance cardiaque sévère. Identifier les personnes à risque d'insuffisance cardiaque est donc une nécessité. Cela permettrait aussi d'adapter un suivi thérapeutique plus rapide, plus facile et moins coûteux. Malheureusement, il n'existe pas de méthode diagnostique de l'insuffisance cardiaque totalement satisfaisante et totalement informative.

On a recherché depuis longtemps des marqueurs présymptomatiques prédictifs de l'insuffisance cardiaque. A cet égard, on a mis en évidence le fait que les cardiomyocytes fabriquent et sécrètent des peptides à activité natriurétique : un peptide d'origine auriculaire, l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) découvert chez le rat par de Bold et al. *Life Science* 1981, vol. 28(1) : 89-94, et un peptide natriurétique d'origine auriculo-ventriculaire dénommé BNP (Brain Natriuretic Peptide) découvert par Sudoh et al., *Nature* 1988, vol. 332 : 78-81 chez le porc, puis ensuite chez l'homme.

Le précurseur du BNP est le préproBNP(1-134), forme de stockage de la molécule à l'intérieur des cardiomyocytes. Celui-ci est clivé pour libérer un peptide signal et le proBNP(1-108). Le proBNP(1-108) consiste en un polypeptide de 108 acides aminés, de séquence:

H₁PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLELQVEQTSLEPLQESPRPTGV
WKSREVATEGIRGHRKMLVLYTLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS GCFGRKMDRISSSS

GLGCKVLRRH₁₀₈ (SEQ ID N° 1). Il est clivé, avant et/ou pendant sa sécrétion, entre les acides aminés Arg⁷⁶ et Ser⁷⁷ en, d'une part, le BNP, encore désigné BNP(77-108) ou BNP-32, voire BNP(1-32), et la partie N-terminale de la prohormone, le BNP(1-76), encore désigné fragment N-terminal du proBNP ou NT-proBNP.

Le BNP ou BNP(77-108), forme vasoréactive de la molécule, consiste en un peptide de 32 acides aminés, de séquence :

S₇₇PKMVQGS GCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH₁₀₈ (SEQ ID N° 2).

Le NT-proBNP ou BNP(1-76) consiste en les 76 acides aminés N-terminaux du proBNP(1-108) constituant la séquence suivante :

H₁PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSELQVEQTSLEPLQESPRPTGV
WKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPR₇₆ (SEQ ID N° 3).

Le taux plasmatique de BNP hormonal, le BNP(77-108), est élevé chez les patients présentant une dystrophie ventriculaire. On a d'ailleurs décrit des dosages plasmatiques du BNP(77-108) l'utilisant comme marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque ventriculaire. Cependant, il est bien connu que l'hormone BNP(77-108) est peu stable. Il en résulte que son dosage nécessite des précautions particulières (Davidson, N. C. et al. Circulation 1995; 91:1276) (Gobinet-Georges et al. Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38:519-23). De plus, la demi-vie du BNP très courte et sa concentration plasmatique est peu élevée. Il en résulte qu'un certain nombre de réponses faussement négatives sont observées chez des sujets à risque d'insuffisance cardiaque. Ainsi, le dosage du BNP(77-108) ne permet pas de discriminer correctement les patients en stade I de la classification NYHA, des sujets sains (Clerico A. et al. J. Endocrinol. Invest. 1998; 21:170-9) (Del Ry S. et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2000; 60:81-90).

Pour contourner cette difficulté, la demande de brevet WO 93/24531 décrit une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque reposant sur la détection du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), un composé abondant et qui a une longue demi-vie en comparaison de celle de l'hormone BNP(77-108). Toutefois, la méthode décrite dans la demande WO 93/24531 ne paraît pas simple à mettre en œuvre sur le BNP(1-76) en échantillons sanguins. En effet, les seuls exemples montrés sont réalisés, non sur des

sérums réels, mais sur des gammes étalons obtenues à l'aide d'un peptide synthétique, le peptide BNP(47-64), sous-séquence du BNP(1-76). Pour pallier cet inconvénient, un système automatisé hautement sophistiqué s'est avéré, depuis, nécessaire.

5 L'article Hunt et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 214(3), 1995, pp. 1175-1183 décrit un dosage RIA de type compétitif du BNP(1-76) sur plasmas de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, faisant intervenir un antisérum dirigé contre le fragment N-terminal du proBNP(1-13). L'article montre précisément que, chez des insuffisants
10 cardiaques, le taux de BNP(1-76), très bien corrélé à celui du BNP(77-108), est considérablement élevé par rapport au taux observé chez des sujets témoins. Cependant, le protocole décrit pour extraire spécifiquement le seul BNP(1-76) plasmatique est complexe, puisqu'il nécessite une extraction du plasma sur cartouche Sep-pak C18TM (Millipore-Waters), suivie d'une
15 chromatographie HPLC. Par ailleurs, cet article souligne que, dans le dosage RIA ainsi mis en œuvre, le proBNP(1-108) ne paraît pas reconnu. Il suggère plutôt que le proBNP(1-108) pourrait être sécrété dans la circulation à partir du tissu cardiaque mais serait ensuite rapidement dégradé en un peptide plus petit, par clivage des acides N-terminaux. Ou encore, selon l'article, le
20 proBNP(1-108) serait présenté d'une façon telle que l'antisérum anti proBNP(1-108) serait incapable de se lier à lui. Enfin, les auteurs suggèrent que le BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) pourrait même être un marqueur plus spécifique du dysfonctionnement cardiaque que le BNP(77-108) ou que le fragment N-terminal du proANP.

25 L'article Karl et al. (*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1999 ; 59(suppl 230) : 177-181) décrit une méthode de détection du BNP(1-76) similaire à celle de la demande de brevet WO93/24531, mais il ne fournit aucun résultat obtenu sur échantillons de patients.

L'article Schulz et al. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2001, vol. 61,
30 pp. 33-42, décrit également un dosage radioimmunologique spécifique du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), sans extraction, à l'aide d'un antisérum dirigé contre les acides aminés 1-21 de ce fragment. Les auteurs confirment l'intérêt du dosage du BNP(1-76) en diagnostic de l'insuffisance

cardiaque ventriculaire ainsi que sa bonne corrélation avec le dosage du BNP(77-108). Lors d'une étude des différentes formes circulantes du proBNP(1-108), ils avancent l'hypothèse que le proBNP(1-108) circulerait dans le sang, à la fois sous forme de prohormone intacte et de produits de clivage, BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) et BNP(77-108). Cependant rien n'est dit ou suggéré dans l'article concernant une éventuelle activité physiologique du proBNP(1-108) ou un intérêt diagnostique quelconque du proBNP(1-108) en tant que marqueur prédictif ou diagnostique de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

L'article Shimizu et al. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 316, pp. 129-135, présente une étude sur la dégradation du BNP humain dans le sang et les formes moléculaires circulantes de BNP immunoréactif dans le plasma d'insuffisants cardiaques. Il observe dans le plasma de ces derniers la présence de deux formes de BNP immunoréactif : un BNP de haut poids moléculaire (de 36 KD, qui pourrait correspondre à un trimère du proBNP(1-108)) et un BNP de bas poids moléculaire. Ce dernier correspond à la présence simultanée d'une forme de produit de dégradation du BNP-32 ayant perdu la sérine et la proline N-terminales (c'est la des-SerPro-BNP (BNP3-32)) de la forme hormonale du BNP-32 (ici appelée BNP(1-32)). Le proBNP(1-108) et le BNP hormonal (BNP-32, BNP(1-32) ou encore BNP(77-108)) sont donc sécrétés par le cœur dans le sang. Néanmoins, les auteurs semblent suggérer que le proBNP(1-108) sous sa forme oligomérisée (trimère) est présent en concentration proche de celle du BNP(77-108) circulant, mais ils ne la mesurent pas. Par voie de conséquence, la corrélation de la concentration du proBNP(1-108) avec l'état clinique des patients n'est pas étudiée. Il s'ensuit que l'intérêt diagnostique ou pronostique du proBNP(1-108) sérique n'y est pas démontré. Il n'est pas non plus suggéré qu'il soit possible de doser ce dernier en routine.

Il existe donc toujours un besoin, dans le cadre du diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque, de disposer d'une méthode qui évite les inconvénients de l'art antérieur. En particulier, il existe un besoin de disposer d'une méthode simple, utilisable en routine et fiable, qui évite les inconvénients

de la détection du BNP(77-108), molécule peu abondante et peu stable, tout en évitant les extractions complexes, occasionnées par le dosage d'autres formes moléculaires de BNP, et qui peuvent aller éventuellement jusqu'à requérir une automatisation sophistiquée.

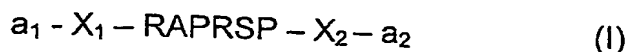
5 Les auteurs de la présente invention se sont donc attachés à mettre au point une méthode alternative pour résoudre le problème posé. Au cœur de la présente invention se trouve la découverte inattendue, faite par les inventeurs, d'un épitope aux propriétés uniques situé dans le domaine du peptide charnière Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ (SEQ ID N° 4) du proBNP(1-108) et
10 comprenant au minimum la séquence RAPR₇₆S₇₇P (SEQ ID N° 5).

En effet, lors d'une immunisation pratiquée chez le lapin avec un peptide de la région charnière du proBNP(1-108), de séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ (SEQ ID N° 4), ils ont découvert de façon
15 surprenante que l'antisérum obtenu non seulement contenait des anticorps qui reconnaissaient de façon spécifique ledit peptide de la région charnière sans substantiellement reconnaître les formes du BNP(1-76) et du BNP(77-108), mais en plus avait la capacité de reconnaître le proBNP(1-108) circulant.

Les auteurs de la présente invention ont, en outre, montré pour la première fois que le proBNP(1-108) circulant était effectivement un marqueur
20 prédictif de l'insuffisance cardiaque et qu'il était présent en concentration significativement plus élevée chez les insuffisants cardiaques que chez des sujets témoins sains.

Les auteurs ont également découvert qu'une autre façon d'obtenir ce type d'anticorps est d'immuniser des animaux à l'aide de la molécule complète
25 de proBNP(1-108). En effet, les auteurs ont trouvé que l'immunisation avec la molécule complète de proBNP(1-108) permettait d'induire l'apparition d'anticorps reconnaissant de façon spécifique un peptide de la région charnière.

De plus, les auteurs de la présente invention ont démontré que l'épitope
30 minimum reconnu par les anticorps selon l'invention avait la séquence suivante : RAPR₇₆S₇₇P. Ils ont montré, en outre, qu'une bonne façon d'obtenir les anticorps objets de la présente invention est d'immuniser des animaux avec un peptide de formule générale:



où

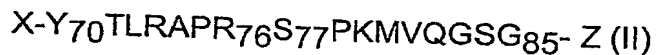
a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi
5 parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

10 X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoxyle.

De même, les auteurs de la présente invention ont montré qu'il était
15 possible d'obtenir les mêmes anticorps spécifiques par immunisation d'un animal avec un peptide comprenant la séquence ~~$\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$~~ ou avec un peptide de formule :



où X peut être H ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides
20 aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

Les auteurs de la présente invention ont de plus mis au point une
méthode simple et fiable de diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque
25 reposant sur la détection du proBNP(1-108) circulant dans le sang et une trousse permettant la mise en œuvre de cette détection du proBNP(1-108) circulant.

La présente invention a donc pour objet un anticorps anti proBNP(1-
108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique le
30 peptide $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85}$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique le peptide $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

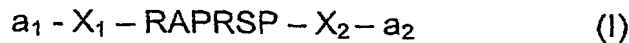
La présente invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85}$ et/ou le peptide $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108), puis en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

Par « épuisement d'un antisérum » obtenu contre un antigène spécifique donné (l'antigène immunisant), on entend l'élimination d'anticorps non spécifiques, potentiellement présents dans cet antisérum, par la mise en contact et l'incubation dudit antisérum avec des « antigènes non spécifiques », c'est à dire des antigènes différents de l'antigène immunisant, puis séparation et élimination immunologiques des anticorps ayant réagi avec lesdits « antigènes non spécifiques » et récupération de l'antisérum ainsi épuisé (c'est-à-dire appauvri en anticorps non spécifiques). L'épuisement sert classiquement à rendre spécifique un antisérum dirigé contre un antigène donné.

Dans le présent cas, un antisérum reconnaissant le peptide $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85}$ ou le peptide $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ du proBNP(1-108) peut être épuisé, c'est à dire rendu spécifique, par mise en contact avec le BNP(77-108) et/ou le BNP(1-76) susnommés, ces derniers pouvant, par exemple, être immobilisés en phase solide et servir de support à une chromatographie par immunoabsorption selon des techniques conventionnelles, connues de l'homme du métier. L'anticorps présent finalement dans l'antisérum épuisé est ici un anticorps

polyclonal monospécifique.

La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :



où

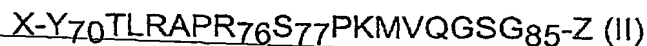
5 a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle

15 La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

20 A noter que dans la formule (II) ci-dessus, le numéro des acides aminés (Y_{70} , $\text{R}_{76}\text{S}_{77}$, G_{85}) a été maintenu simplement pour aider à la compréhension de l'invention et au repérage de cette séquence vis-à-vis de la séquence proBNP(1-108). Il en est de même des autres séquences présentées avec des numéros dans cette demande.

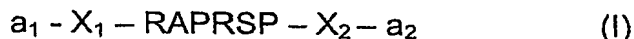
L'invention concerne aussi tout peptide contenant la séquence $\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQSG}_{85}\text{-Z (II)}$ susdite sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, en l'un quelconque des acides aminés de la position 70 à la position 85 à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$.

30 Il s'agit donc d'un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence $\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQSG}_{85}\text{-Z (II)}$ par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et

G₈₅, avec X pouvant être absent ou représenter soit une fonction NH₂, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z pouvant être absent ou représenter soit une fonction OH, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

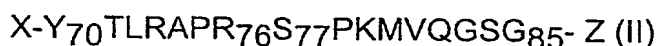
5 L'invention concerne enfin le peptide de séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la
10 capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :



15 où a₁, X₁, X₂, et a₂ ont la même signification que ci-dessus, et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu. L'anticorps ainsi obtenu est un anticorps monospécifique.

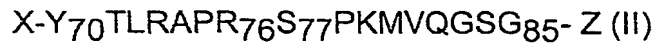
L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti
20 proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on
25 immunise un animal avec un peptide de formule :



où X et Z sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

30 L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et

ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :

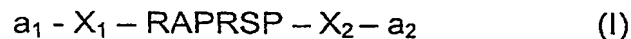


- 5 sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion $RAPR_{76}S_{77}P$, où X et Z sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti
10 proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ et/ou le peptide $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce
15 que l'on immunise un animal avec le peptide de séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$, et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le
20 peptide $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ et/ou le peptide $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que :

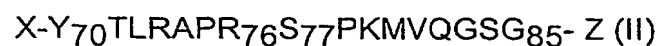
- 25 - on immunise un animal avec un peptide choisi parmi les peptides de formules suivantes :



où a_1 , X_1 , X_2 , et a_2 ont la même signification que ci-dessus,

30 $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z \text{ (II)}$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,



sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P, où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

5 Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅,

- on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal, et en ce que

- on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobulines.

10 Ceci correspond à la technique classique d'obtention des hybridomes dont le principe est décrit dans Köhler et Milstein, (1975) Nature (London), 256 :495-497.

L'invention a encore pour objet un tel hybridome et l'anticorps anti proBNP(1-108) monoclonal sécrété par ledit hybridome.

15 La présente invention a en outre pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le

20 proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

L'invention fournit de manière générale une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

25

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains,
- 30 b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé
5 contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

En particulier, l'invention fournit une méthode de diagnostic de l'insuffisance cardiaque qui comprend, en plus des étapes a, b et c susdites, une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

10 La présente invention a de plus pour objet une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou sérum, contenant au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-
15 108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

L'invention vise enfin une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou
20 sérum, contenant, comme étalon et/ou témoin, un composé contenant au moins un peptide choisi dans le groupe de peptides de formules suivantes :

$$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2 \quad (\text{I})$$

où a_1 , X_1 , X_2 , et a_2 ont la même signification que ci-dessus,

25

$$\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85}\text{-Z (II)}$$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85}\text{-Z (II)}$$

30 sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P, où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅.

5

Définitions

Dans le contexte de l'invention, un « *échantillon biologique* » ou encore un « *échantillon de fluide biologique* » est de préférence constitué par un liquide biologique, tel que du sang, plasma, sérum, de l'urine, du liquide céphalorachidien, de la salive, etc...

10

Par « insuffisance cardiaque », on entend l'état pathologique dans lequel une anomalie de la fonction cardiaque est responsable de l'incapacité du cœur à pomper le sang de façon suffisante pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme et/ou dans lequel le cœur pourvoit aux besoins mais avec des pressions de remplissage anormalement élevées. Il peut
15 notamment s'agir d'une insuffisance ventriculaire droite et/ou gauche.

Le terme « *anticorps* » se réfère à tout anticorps entier ou fragment fonctionnel d'un anticorps (obtenu par génie génétique ou non), comprenant, ou consistant en, au moins un site de combinaison antigénique, permettant audit anticorps de se lier à au moins un déterminant antigénique d'un composé
20 antigénique. A titre d'exemple de fragments d'anticorps on peut citer les fragments Fab, Fab', F(ab')₂ ainsi que les fragments variables à simple chaîne (chaînes scFv).

Les anticorps anti proBNP(1-108) selon l'invention peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Un anticorps polyclonal anti proBNP(1-108) selon
25 l'invention peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin, une souris, etc.. à l'aide du proBNP(1-108) entier, prélèvement puis épuisement de l'antisérum obtenu sur, par exemple, un immunoabsorbant contenant du BNP(77-108) et/ou du BNP(1-76) selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal anti proBNP(1-108)
30 selon l'invention peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256 : 495- 497 (1975)).

La production d'anticorps monoclonaux ou de sérums polyclonaux monospécifiques, ou d'anticorps obtenus par criblage de banques

génomiques, utiles dans le cadre de l'invention relève de techniques conventionnelles, qui sont détaillées plus loin.

Par « anticorps de capture », on entend un anticorps ou une partie d'anticorps, de préférence fixé sur une phase solide, qui est capable de retenir
5 l'antigène proBNP(1-108) présent dans un échantillon biologique, par liaison affine.

La présence de l'antigène dans l'échantillon biologique est révélée par des « moyens de détection ». S'agissant de la détection de l'antigène, l'invention prévoit notamment une détection à l'aide d'au moins un « anticorps
10 de détection ». Un tel anticorps de détection, marqué, est capable de se lier à l'antigène capturé, par liaison affine, en reconnaissant un site épitopique, différent de celui reconnu par l'anticorps de capture.

Le terme « marqué » se réfère aussi bien à un marquage direct (par le biais d'enzymes, radioisotopes, fluorochromes, composés luminescents, etc)
15 qu'à un marquage indirect (par exemple, par le biais d'anticorps eux-mêmes ~~marqués de manière directe ou à l'aide de réactifs d'une « paire d'affinité »~~ marquée, telle que, mais non exclusivement, la paire avidine marquée-biotine, etc..).

Par « fragment antigénique », on entend toute partie du proBNP(1-108)
20 capable d'induire la synthèse d'anticorps substantiellement spécifique du seul proBNP(1-108) chez un animal immunisé.

Conformément à la présente invention, un « fragment antigénique » contient au moins le « site épitopique » ou épitope RAPR₇₆S₇₇P. Un « site épitopique » ou « épitope » est une séquence d'acides aminés qui est
25 reconnue par au moins un anticorps et permet la liaison spécifique de celui-ci.

Le terme « anticorps polyclonal monospécifique », s'applique à tout anticorps polyclonal présentant une spécificité pour un seul épitope. Ceci signifie que l'anticorps est capable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) contenant les acides aminés comprenant
30 l'épitope, mais est incapable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) qui ne contient pas les acides aminés comprenant l'épitope.

Le terme « spécifiquement », quand il se réfère à une reconnaissance

ou une liaison spécifique d'un anticorps pour un antigène, signifie que l'anticorps interagit avec l'antigène sans interaction substantielle avec d'autres antigènes, ou si l'on parle de reconnaissance « spécifique » avec un épitope, par reconnaissance quasi-exclusive de cet épitope. Des constantes
 5 d'association supérieures à 10^8 L.mol^{-1} sont préférables.

Par « substitution conservatrice », on entend notamment la substitution d'un acide aminé d'une classe par un acide aminé de la même classe, substitution qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine. Parmi les différentes classes
 10 d'acides aminés on distingue généralement les acides aminés à chaîne latérale polaire (tel que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine et la tyrosine), les acides aminés à chaîne latérale non polaire (tel que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane et la cystéine), les acides aminés à chaîne latérale basique (tel
 15 que la lysine, l'arginine et l'histidine), et les acides aminés à chaîne latérale acide (tel que l'acide aspartique et l'acide glutamique).

Par « substitution non conservatrice », on entend tout autre type de substitution, qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine.

20 La non-reconnaissance « *substantielle* » des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108) se réfère à une absence ou quasi-absence de réaction des anticorps de l'invention avec ces peptides.

Production d'anticorps spécifiques

25 Les anticorps utilisés dans la présente invention sont des anticorps spécifiques de l'antigène, et, pour cette raison, sont des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux monospécifiques, c'est à dire qu'ils ne reconnaissent spécifiquement qu'un épitope.

30 Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de fusion lymphocytaire et culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein, Nature, 1975, 256 : 495-497. D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues (Harlow et al, ed., 1988 « Antibodies : a laboratory manual »). Les anticorps monoclonaux peuvent être

préparés en immunisant un mammifère (par exemple une souris, un rat, un lapin, voire un être humain, etc...) et en utilisant la technique de fusion lymphocytaire conduisant à des hybridomes (Köhler et Milstein, 1975).

Des techniques alternatives à cette technique usuelle existent. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique cloné à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage (« phage display »), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E.coli, Scott, J.K. et Smith, G.P., Science, 1990, 249 :386-390). Des protocoles de construction de ces banques d'anticorps sont décrits dans Marks et al, 1991, J. Mol. Biol, 222 :581-597).

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre un antigène de nature peptidique selon les modes opératoires usuels. Les anticorps polyclonaux ainsi obtenus pourront, si besoin est, et par épuisement avec du BNP(77-108) et du BNP1-76, selon des techniques en soit connues de l'homme du métier comme, par exemple, l'immunoabsorption sur colonne, être rendus monospécifiques de la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou d'un peptide comprenant la séquence RAPR₇₆S₇₇P, assurant ainsi la spécificité vis à vis du proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

Anticorps de capture et/ou de détection

En technique sandwich, l'anticorps de capture est choisi de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un épitope, sur l'antigène naturel du patient, tandis que l'anticorps de détection est choisi, de préférence, mais non obligatoirement de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un autre épitope, sur l'antigène naturel du patient.

L'échantillon biologique peut être éventuellement traité dans une étape préalable, ou mis directement en présence d'au moins un anticorps de capture dans des conditions favorisant l'exposition de l'épitope à détecter.

Le procédé de diagnostic selon l'invention peut être réalisé selon divers formats bien connus de l'homme du métier : en phase solide ou en phase

homogène ; en un temps ou en deux temps ; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs.

Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, telles que celles commercialisées par la société Nunc, Danemark. On peut également utiliser des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques, telles que celles fournies par Dynal ou Merck-Eurolab (France) (sous la marque EstaporTM), ou encore des tubes à essai en polystyrène ou polypropylène, etc...

Un format d'immunoessai de type sandwich entre deux anticorps (de capture et de détection) est particulièrement avantageux pour la détection des antigènes présents dans l'échantillon biologique.

Un format d'immunoessai de détection des antigènes par compétition est également possible. D'autres modalités d'immunoessai sont encore envisageables et bien connues de l'homme du métier.

Dosages ELISA, radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en œuvre pour révéler la présence des complexes antigènes-anticorps formés.

Trousses

Les trousse et réactifs utiles pour la détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique, conformément au procédé de l'invention, peuvent être fournis pour une mise en pratique de l'invention facile et applicable à de nombreux échantillons biologiques.

Des trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique peuvent contenir au moins un anticorps tel que défini précédemment. D'autres trousse, contenant comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide de formule (I), (II) ou un peptide substitué tel que défini précédemment, peuvent également être utiles à la mise en œuvre de l'invention.

Un autre objet particulier de l'invention est donc une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique,

comprenant :

- au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et qui est de préférence un anticorps de capture dudit proBNP(1-108) présent dans l'échantillon biologique, et
- un conjugué marqué capable de se lier spécifiquement aux complexes antigènes anticorps formés.

Comme cela est décrit ci-dessus, l'anticorps de capture peut être présenté de manière avantageuse sous une forme immobilisée sur une phase solide, telle qu'une microplaque, par exemple, mais non exclusivement.

Une trousse préférée comprend au moins :

- un anticorps de capture anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, ledit anticorps de capture étant immobilisé sur une phase solide ; et
- un anticorps de détection, marqué, dirigé contre un autre épitope, intact, du proBNP(1-108), ou éventuellement,
- un antigène de détection, marqué, qui est un peptide du proBNP(1-108) ou le proBNP(1-108) lui-même.

Selon un mode de réalisation particulier, une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, peut contenir :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini précédemment ;
- dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini précédemment, utile notamment comme étalon et/ou témoin.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES :

La figure 1 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du lapin #046 805 purifiés sur protéine A-sépharose avec le proBNP (1-108), le fragment BNP(1-76), le BNP(77-108), et la GST (Glutathion-S-transférase, utilisée comme protéine témoin) adsorbés sur microplaque à 5 µg/ml.

La figure 2 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du filtrat obtenus après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 5 µg/ml.

La figure 3 représente la réactivité de l'éluat du sérum polyclonal du lapin #046 805 obtenu après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose.

Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 5 µg/ml.

La figure 4 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin #046 805 avant épuisement. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de $30,4 \pm 5,93$ unités relatives d'intensité.)

La figure 5 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin #046 805 après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de $31,3 \pm 6,31$ unités relatives d'intensité.)

La figure 6 représente une courbe d'étalonnage du dosage IRMA du proBNP(1-108).

La figure 7 montre les résultats en cpm (coups par minute de radioactivité) du dosage IRMA du proBNP(1-108) des prélèvements de 6 sujets sains et de 7 patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

La figure 8 représente une courbe d'étalonnage du dosage ELISA du proBNP(1-108).

La figure 9 représente une évaluation de la réaction croisée vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), du dosage ELISA proBNP(1-108) combinant l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) avec l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé couplé à la biotine.

La figure 10 représente l'évaluation de la réaction croisée vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), du dosage ELISA proBNP(1-108) combinant un anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29) avec l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé couplé à la biotine.

5

EXEMPLES

Exemple 1 : synthèse de peptides pour immunisation

Les peptides synthétiques sont produits par les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer, comme exemple, la
10 synthèse de type Merrifield qui est avantageuse vu sa facilité de mise en œuvre (Merrifield, (1963); R.C.Sheppard (1971) ; Atherton et al. (1989)). Comme synthétiseur automatique, on peut utiliser le synthétiseur "9050 Plus Pep Synthesizer" de Millipore, le "Pioneer" de Perspective, ou le synthétiseur
15 "433A" de ABI. Les peptides peuvent également être obtenus par synthèse en phase homogène.

Les synthèses ci-après ont été réalisées sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) : à chaque étape les réactifs (c'est à dire l'acide aminé protégé et les activateurs de couplage
20 (TBTU(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium tétrafluoroborate)/ HOBt (N-hydroxybenzotriazol)) sont ajoutés en excès (dans un rapport « moles de réactifs /moles de groupes substituables sur la résine » = 5). A la fin de la synthèse, le peptide est séparé de la résine par une solution à base d'acide trifluoroacétique (réactif K). Le peptide est ensuite précipité dans une solution
25 d'éther refroidie, puis purifié par HPLC.

Les inventeurs ont procédé à la synthèse des peptides contenant la séquence d'acides aminés de la région charnière R₇₆S₇₇ suivants :

SEQ ID N° 6 :	C-G-R-A-P-R-S-P
30 SEQ ID N° 7 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P
SEQ ID N° 8 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K
SEQ ID N° 9:	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K
SEQ ID N° 10:	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V

	SEQ ID N° 11 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
	SEQ ID N° 12 :	R-A-P-R-S-P-G-C	
	SEQ ID N° 13 :	Acetyl -R-A-P-R-S-P-G-C	
	SEQ ID N° 14 :	Acetyl -C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K	
5	SEQ ID N° 15 :	C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K	
	SEQ ID N° 16 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	(peptide C13P30)
	SEQ ID N° 17 :	C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
	SEQ ID N° 18 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
10	SEQ ID N° 19 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA	
	SEQ ID N° 20 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA	
	SEQ ID N° 21 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA	
	SEQ ID N° 22 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A	

15 NB : βA signifie bêta-alanine.

L'invention a donc aussi pour objet un peptide quelconque choisi dans le groupe constitué par les séquences : SEQ ID N°6 à SEQ ID N° 15 et SEQ ID N°17 à SEQ ID N°22 ci-dessus.

20 Exemple 2 : Couplage d'un peptide à une protéine porteuse pour immunisation

On couple le peptide à une protéine porteuse la KLH (Keyhole Lympet Hemocyanin), La thyroglobuline, la BSA (Bovine Serum Albumin, via différentes fonctions (thiol, amine, aldéhyde...) de façon à rendre le peptide plus immunogène. L'agent de couplage utilisé pour lier le peptide à la protéine peut être hétéro- ou homo-bifonctionnel. Les réactifs les plus couramment utilisés sont le BS 3, le sSMCC, le SPDP, le glutaraldéhyde... L'une des techniques de couplage utilisées est celle qui utilise comme agent chimique de couplage le glutaraldéhyde et comme protéine porteuse la KLH. Le couplage de la KLH sur le peptide est réalisé à partir des fonctions amines du peptide (groupement N-terminal et groupement amine porté par la lysine principalement).

Une solution du peptide C13P30 de séquence Cys-

YTLRAPRSPKMOVQSG-NH₂ (SEQ ID N° 16) à 5mg/ml est préparée en tampon PBS Dulbecco NaCl 0,15M à pH 7,4. Un flacon de 20mg de KLH lyophilisée en tampon PBS (Pierce #77600) est repris par 2ml d'eau PPI (eau pour préparation injectable), de façon à obtenir une solution de KLH à 10mg/ml en tampon PBS.

1 ml de la solution de peptide (soit 5mg) est mélangée avec 1,25ml de la solution de KLH (soit 12,5mg). Sous hotte aspirante, 2,25ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2% préparée extemporanément (à partir de glutaraldéhyde à 25%, Sigma #G-5882) sont ajoutés au mélange. Afin d'éviter la formation de complexes de KLH, la solution de glutaraldéhyde à 2% est ajoutée goutte à goutte et sous agitation du mélange. La réaction de conjugaison se fait pendant 2 heures 30 d'incubation à température ambiante. La réaction de couplage est stoppée par ajout d'une solution de borohydrure de sodium à 100 mg/ml de façon à atteindre une concentration finale de 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber une nuit à 4°C. Enfin la solution est dialysée sur une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. La solution est enfin aliquotée et conservée à -80°C.

20 Exemple 3 : Immunisations avec des peptides

Pour la production d'anticorps polyclonaux, des lapins (femelles de souche New Zealand) ont été immunisés à l'aide du peptide Cys-YTLRAPRSPKMOVQSG-NH₂ couplé à la KLH selon l'exemple 2. A la première injection, une émulsion de 1,5 ml de peptide couplé à la KLH avec 1,5 ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 1ml de cette dernière émulsion (soit 200 µg de peptide) est injecté par voie intradermique à chacun des lapins. Deux rappels sont réalisés à 20 jours d'intervalle en injectant par voie intradermique 1ml d'une émulsion de peptide couplé à la KLH (soit 200µg de peptide) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma #F-5506). Vingt jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection sous-cutanée. Vingt jours après ce dernier rappel, et après évaluation du titre en anticorps obtenu, les lapins sont saignés. Plus particulièrement les anticorps

polyclonaux du lapin identifié par le numéro #046 805 ont été utilisés pour la suite des travaux.

5 **Exemple 4 : obtention et purification des anticorps**

Avant purification, les sérums de lapins sont centrifugés 30 minutes à 4 500 tours/minute à 4°C. Après décantation, le sérum est dilué de moitié dans du tampon glycine 1,5M, à pH 8,0 contenant du NaCl 1M.

10 **Exemple 4.a : purification des IgG sur protéine A-sépharose**

La purification des anticorps polyclonaux est réalisée par chromatographie d'affinité sur un gel de protéine A-sépharose (Amersham Biosciences #17.1279.02). La protéine A extraite de *Staphylococcus aureus* se combine spécifiquement au fragment Fc des molécules d'IgG. Ensuite les IgG, toutes sous classes confondues, sont éluées à pH 3,0.

Tous les tampons utilisés sont dégazés pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons avant passage dans la colonne, afin de prévenir la formation de bulles.

Une colonne de chromatographie est préparée à l'aide de 12 ml de protéine A-sépharose. La colonne de gel est équilibrée pendant 40 minutes avec de l'eau distillée et dégazée, puis pendant 40 minutes avec du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant du NaCl 0,5 M, et enfin avec du tampon glycine 1,5 M à pH 8,0 contenant du NaCl 1M, ceci jusqu'à obtention d'une ligne de base correcte.

Ensuite, 10ml de sérum de lapin dilué de moitié en tampon glycine 1,5 M à pH 8,0 contenant du NaCl 1 M, sont passés dans la colonne à un débit de 0,5ml/mn. Après apparition du pic d'albumine, les IgG du sérum sont éluées à l'aide d'une solution d'acide citrique 0,1M amenée à pH 3,0 avec du tampon tris sodium de citrate 0,1M. Le pic d'éluion des IgG est récupéré et rapidement mis en dialyse en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 une nuit à 4°C. La concentration des IgG est déterminée après dialyse par lecture de la densité optique à 280 nm contre du tampon PBS.

Après purification sur protéine A, la réactivité des anticorps polyclonaux

est testée sur le proBNP(1-108), le BNP(1-76), et le BNP(77-108). Les résultats obtenus pour les anticorps polyclonaux du lapin #046 805 sont présentés dans la figure 1. Le sérum polyclonal du lapin #046 805 est relativement bien spécifique du proBNP(1-108). Nous avons cependant pu
 5 noter la présence d'une faible réactivité anti-BNP(77-108) à des concentrations élevées, réactivité que nous avons pu supprimer en rendant le polyclonal du lapin #046 805 monospécifique par épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, selon le procédé décrit dans l'exemple 4.b.

10 **Exemple 4.b : Epuisement des IgG sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose**

Le but de cette opération est d'éliminer la réactivité croisée observée vis à vis du BNP(77-108).

La réactivité croisée de l'anticorps polyclonal obtenue étant localisée en position N-terminale de la molécule de BNP(77-108), il était important de bien
 15 présenter cette région du BNP(77-108) aux immunoglobulines à éliminer. A ces fins, le BNP(77-108) a été synthétisé avec une extension de 3 résidus de lysine en position C-terminale (BNP-K₃) afin de favoriser son couplage à la résine NHS-sépharose par son extrémité C-terminale.

Le BNP-K₃ : S-P-K-M-V-Q-G-S-G-C-F-G-R-K-M-D-R-I-S-S-S-S-G-L-G-
 20 C-K-V-L-R-R-H-K-K-K (SEQ ID n° 104) a été synthétisé sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) citée ci-dessus sous l'exemple 1.

5 mg de BNP-K₃ sont dissous à l'aide du tampon NaHCO₃ 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M à une concentration de 10mg/ml. 2ml de résine
 25 NHS-sépharose (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences #17.0906.01) sont centrifugés 30 secondes à 1000 tours/mn à 4°C. La résine est lavée avec 15ml d'une solution d'HCl 1mM froid. Après centrifugation et élimination de la solution d'HCl, la résine est mélangée au ligand BNP-K₃ à 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber

30 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après centrifugation et élimination de la solution de ligand, les groupements non réactifs de la résine sont bloqués à l'aide de 5ml de tampon glycine 0,1M, à pH 8,0. Le mélange est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous

agitation lente. Après centrifugation et élimination du tampon de blocage, la résine est reprise par 5 ml de tampon NaHCO_3 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M. Quatre lavages à l'aide de ce tampon sont réalisés. Au dernier lavage, le mélange est déposé sur une colonne de chromatographie.

5 Après préparation de la colonne de chromatographie, 10mg d'IgG du lapin #046 805 sont déposés sur la colonne. Une pompe péristaltique reliée à la colonne permet de faire circuler les IgG du sérum de lapin toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution d'IgG est récupérée (= filtrat). La fraction d'IgG liée sur le BNP- K_3 est éluée (= éluat) à l'aide du tampon Tris 20mM, à pH 8,0
10 contenant de l'urée 5M. On teste ensuite l'éluat et le filtrat afin de s'assurer de l'efficacité de l'épuisement. Les figures 2 et 3 montrent les résultats de ces tests réalisés en ELISA avec le filtrat et l'éluat, respectivement, du sérum polyclonal du lapin #046 805. Comme c'était attendu, le filtrat du sérum polyclonal du lapin #046 805 est spécifique du proBNP(1-108) : aucune
15 réactivité n'est observée sur le BNP(1-76) ni sur le BNP(77-108). L'éluat conserve une réactivité vis à vis du proBNP(1-108) importante, mais également une réactivité vis à vis du BNP(77-108). Ces résultats confirment l'efficacité de l'épuisement du sérum polyclonal du lapin sur la résine BNP- K_3 -NHS-sépharose.

20 Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées exprimées après clonage dans le vecteur pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) et transfection chez E coli, par les techniques classiques bien
25 connues de l'homme du métier. Le vecteur d'origine a été fourni par la société Berlex Biosciences (Richmond, CA, USA) et sa préparation est décrite par Yan et al. (PNAS, 2000, vol. 97, pp. 8525-8529). La concentration du proBNP(1-108) et celle du BNP(1-76) ont été déterminées par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976; 72:248-54).

30

Exemple 5 : identification de l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin #046 805 avant et après épuisement sur résine BNP- K_3 -NHS-sépharose

Le sérum polyclonal du lapin #046 805 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose a été testé par la méthode spot afin d'identifier l'épitope reconnu par ce sérum polyclonal. Cette méthode, décrite par Frank (Tetrahedron 1992; 48:9217-32), permet la synthèse rapide sur membrane de nitrocellulose d'un grand nombre de peptides de séquences prédéfinies. Les protocoles utilisés sont ceux décrits par Molina et al. (Pept Res 1996; 9:151-5). Sur une feuille de papier sont créées des zones circulaires (spots) d'environ 5 mm de diamètre, comportant une fonction aminée, qui servent de point d'ancrage à l'acide aminé C-terminal du peptide synthétique. L'allongement de la chaîne peptidique s'effectue par additions successives de Fmoc-acides aminés activés. Les chaînes latérales des acides aminés sont bloquées par des groupements chimiques adéquats. Tous les peptides sont synthétisés avec leur résidu N-terminal N-acétylé. A l'issue de la synthèse, les chaînes latérales sont déprotégées par action de l'acide trifluoroacétique. Ce traitement n'affecte pas la liaison entre le peptide et le support cellulosique, et la réactivité des peptides peut être évaluée par un essai colorimétrique.

La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).

Tableau 1: Membrane spot constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 en 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).

Séquence	N° spot	Séquence	N° spot
HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	1	GVWKSREVATEGIRG (SEQ ID n° 39)	17
GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID n° 24)	2	KSREVATEGIRGHRK (SEQ ID n° 40)	18
GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID n° 25)	3	EVATEGIRGHRKMVL (SEQ ID n° 41)	19
SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID n° 26)	4	TEGIRGHRKMVLYTL (SEQ ID n° 42)	20
ETSGLQEQRNHLQGK (SEQ ID n° 27)	5	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 43)	21
GLQEQRNHLQGKLSE (SEQ ID n° 28)	6	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 44)	22
EQRNHLQGKLSELQV (SEQ ID n° 29)	7	MVLYTLRAPRSPKMOV (SEQ ID n° 45)	23
NHLQGKLSELQVEQT (SEQ ID n° 30)	8	YTLRAPRSPKMOVQGS (SEQ ID n° 46)	24
QGKLSELQVEQTSLE (SEQ ID n° 31)	9	RAPRSPKMOVQGS GCF (SEQ ID n° 47)	25
LSELQVEQTSLEPLQ (SEQ ID n° 32)	10	RSPKMOVQGS GCFGRK (SEQ ID n° 48)	26
LQVEQTSLEPLQESP (SEQ ID n° 33)	11	KMOVQGS GCFGRKMDR (SEQ ID n° 49)	27
EQTSLEPLQESPRPT (SEQ ID n° 34)	12	QGS GCFGRKMDRISS (SEQ ID n° 50)	28
SLEPLQESPRPTGVW (SEQ ID n° 35)	13	GCFGRKMDRISSSSG (SEQ ID n° 51)	29
PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 36)	14	GRKMDRISSSSSGLGC (SEQ ID n° 52)	30
ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 37)	15	MDRISSSSSGLGCKVL (SEQ ID n° 53)	31
RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 38)	16	ISSSSGLGCKVLRH (SEQ ID n° 54)	32

Après saturation de la membrane à l'aide du tampon TBS à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, de Blocking buffer à 5% (Euromedex #SU-07-250), et de saccharose à 5%, la réactivité du sérum polyclonal de lapin dilué à 10µg/ml est testée (sur une incubation de 1 heure 30 minutes à 37°C sous agitation). Après lavage avec le tampon TBS à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, le conjugué anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma #A-8025) est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation. Enfin, après une dernière série de lavages, la révélation des spots est réalisée à l'aide du substrat composé de 30ml de tampon CBS à pH 7,0 dans lequel on ajoute 120µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-Indolyl phosphate 0,15M), 150µl de MgCl₂ 1M et 180µl de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide 0,1M). Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités relatives d'intensité) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond est calculé à partir des spots non détectés par l'antisérum. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin #046 805 avant épuisement sont présentés dans la figure 4. Cinq peptides (spots 22 à 26) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces cinq peptides est R₇₆S₇₇P. Cependant, la réactivité est nettement augmentée lorsque le motif RAP se rajoute en position N-terminale du motif R₇₆S₇₇P. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin #046 805 après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose sont présentés dans la figure 5. Quatre peptides (spots 22 à 25) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces 4 peptides est RAPR₇₆S₇₇P. Contrairement à ce qui est observé pour le sérum polyclonal avant épuisement, aucune réactivité sur le motif R₇₆S₇₇P seul n'est observé (spot 26). Ceci explique qu'après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, le sérum polyclonal ne détecte plus le BNP(77-108) [pour rappel, le motif S₇₇P correspond aux deux premiers acides aminés de la séquence du BNP(77-108)]. En conclusion l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin #046 805 rendu monospécifique est RAPR₇₆S₇₇P.

Exemple 6 : identification de l'épitope minimum

Le sérum polyclonal du lapin #046 805, avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, a été testé par la méthode spot (décrite dans l'exemple 5) afin d'identifier l'épitope minimum, dans le peptide charnière, permettant la reconnaissance spécifique du seul proBNP(1-108) par le sérum polyclonal. Nous avons synthétisé une membrane constituée de 16 pentadécapeptides reprenant la séquence du peptide charnière YTLRAPRSPKMOVQGS une substitution successive de chaque acide aminé par un résidu alanine (Alanine-scanning ou « Ala-scan ») ou glycolle (tableau II). Les résultats de l'analyse Ala-scan du sérum polyclonal du lapin #046 805 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : membrane spot constituée de 16 pentadécapeptides reprenant la séquence du peptide charnière YTLRAPRSPKMOVQGS avec une substitution successive de chaque acide aminé par un résidu alanine (Alanine-scanning) ou glycolle. Réactivité du sérum polyclonal du lapin #046 805 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose.

SEQ ID	Séquence	N° spot	Réactivité (en unités relatives d'intensité) sérum polyclonal lapin #046 805 non épuisé	Réactivité (en unités relatives d'intensité) sérum polyclonal lapin #046 805 épuisé
SEQ ID n° 46	YTLRAPRSPKMOVQGS	716	84	69
SEQ ID n° 55	ATLRAPRSPKMOVQGS	717	90	68
SEQ ID n° 56	YALRAPRSPKMOVQGS	718	101	71
SEQ ID n° 57	YTARAPRSPKMOVQGS	719	108	77
SEQ ID n° 58	YTLAAPRSPKMOVQGS	720	101	<u>39</u>
SEQ ID n° 59	YTLRGPRSPKMOVQGS	721	93	<u>39</u>
SEQ ID n° 60	YTLRAARSPKMOVQGS	722	103	96
SEQ ID n° 61	YTLRAPASPKMOVQGS	723	<u>50</u>	<u>23</u>
SEQ ID n° 62	YTLRAPRA ^u PKMOVQGS	724	<u>58</u>	<u>44</u>
SEQ ID n° 63	YTLRAPRSAKMOVQGS	725	<u>74</u>	<u>41</u>

SEQ ID n° 64	YTLRAPRSP <u>A</u> MVQGS	726	138	118
SEQ ID n° 65	YTLRAPRSPK <u>A</u> VQGS	727	98	77
SEQ ID n° 66	YTLRAPRSPKMA <u>Q</u> GS	728	100	68
SEQ ID n° 67	YTLRAPRSPKM <u>V</u> AGS	729	95	71
SEQ ID n° 68	YTLRAPRSPKMVQ <u>A</u> S	730	107	78
SEQ ID n° 69	YTLRAPRSPKMVQGA	731	112	68

Les acides aminés critiques dans la reconnaissance de l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin #046 805 avant épuisement sont R₇₆S₇₇P, tandis qu'après épuisement du sérum polyclonal du lapin #046 805 sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, outre le motif R₇₆S₇₇P, le motif RA devient contributeur. Ces résultats montrent donc que l'épitope minimum obligatoire dans la reconnaissance spécifique du proBNP(1-108) par le sérum polyclonal du lapin #046 805 est RAPR₇₆S₇₇P.

10

Exemple 7 : Immunisation de souris avec la protéine recombinée proBNP(1-108)

On a immunisé des souris de souche BALB/c (femelles âgées de 6 semaines) à l'aide du proBNP(1-108) recombiné décrit dans l'exemple 4.b, par les techniques classiques bien connues de l'homme du métier. A la première injection, une émulsion de 1 ml de proBNP avec 1ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 300µl de cette émulsion (soit 100µg de protéine) sont injectés par voie sous-cutanée à chacune des souris. Deux rappels sont réalisés à 15 jours d'intervalle par injection par voie intrapéritonéale de 300µl d'une émulsion de proBNP(1-108) (soit 100µg de peptide) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma # F-5506). Quinze jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection sous-cutanée. Enfin, 15 jours après ce dernier rappel, on réalise des prélèvements sanguins sur les souris pour analyser la réponse immunitaire par la technique spot. La réponse immunitaire de la souris 12 s'est avérée particulièrement intéressante pour la suite des travaux.

Exemple 8 : Identification des épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108)

5 Le principe de la technique spot utilisée pour identifier les épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108) est décrit dans l'exemple 5.

10 La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 94 pentadécapeptides, décalés d'un résidu d'acide aminé, représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108). La réactivité du sérum polyclonal de la souris 12 dilué au 1/500ème est testée sur cette membrane comme cela est décrit dans l'exemple 5. Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités relatives d'intensité) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond est calculé à partir des spots
15 non détectés par l'antisérum. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal de la souris 12 sont présentés dans le tableau III. Trois régions situées en position N-terminale de la séquence du proBNP(1-108) sont particulièrement bien détectées par les anticorps de l'antisérum de la souris 12 : les spots 1 à 12, 17 à 27, et 38 à 49. De façon surprenante, l'antisérum de la
20 souris 12 contient également des anticorps capables de reconnaître des spots dont la séquence peptidique comprend le motif RAPR₇₆S₇₇P : spots 64 à 68. Les séquences peptidiques de ces spots sont décrites dans le tableau III.

Tableau III : Analyse épitopique, à l'aide de la technique spot, de l'antisérum de la souris 12.

N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité	N° spot	séquence peptidique du spot détecté
1	HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	177,0	38	LEPLQESPRPTGVWK (SEQ ID n° 88)
2	PLGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 70)	170,0	39	EPLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 89)
3	LGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 71)	145,7	40	PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 90)
4	GSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 24)	166,3	41	LQESPRPTGVWKSRE (SEQ ID n° 91)
5	SPGSASDLETSG (SEQ ID n° 72)	185,0	42	QESPRPTGVWKSREV (SEQ ID n° 92)
6	PGSASDLETSG (SEQ ID n° 73)	169,3	43	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 93)
7	GSASDLETSG (SEQ ID n° 25)	155,2	44	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 94)
8	SASDLETSG (SEQ ID n° 74)	176,5	45	SPRPTGVWKSREVAT (SEQ ID n° 95)
9	ASDLETSG (SEQ ID n° 75)	108,0	46	PRPTGVWKSREVATE (SEQ ID n° 96)
10	SDLETSG (SEQ ID n° 76)	118,3	47	RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 16)
11	DLETSG (SEQ ID n° 77)	121,0	48	PTGVWKSREVATEGI (SEQ ID n° 97)
12	LETSG (SEQ ID n° 78)	101,0	49	TGVWKSREVATEGIR (SEQ ID n° 98)
17	LQEQRNHLQGKLSL (SEQ ID n° 79)	99,0	61	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 99)
18	QEQRNHLQGKLSLQ (SEQ ID n° 80)	179,8	62	RGHRKMVLYTLRAPR (SEQ ID n° 10)
19	EQRNHLQGKLSLQV (SEQ ID n° 29)	189,6	63	GHRKMVLYTLRAPRS (SEQ ID n° 10)
20	QRNHLQGKLSLQVE (SEQ ID n° 81)	211,8	64	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 53)
21	RNHLQGKLSLQVEQ (SEQ ID n° 82)	219,0	65	RKMVLYTLRAPRSPK (SEQ ID n° 10)
22	NHLQGKLSLQVEQT (SEQ ID n° 30)	213,3	66	KMVLYTLRAPRSPKM (SEQ ID n° 10)
23	HLQGKLSLQVEQTS (SEQ ID n° 83)	202,6	67	MVLYTLRAPRSPK (SEQ ID n° 45)
24	LQGKLSLQVEQTS (SEQ ID n° 84)	189,5	68	VLYTLRAPRSPK (SEQ ID n° 10)
25	QGKLSLQVEQTSLE (SEQ ID n° 85)	187,3		
26	GKLSLQVEQTSLEP (SEQ ID n° 86)	36,6		
27	KLSELQVEQTSLEPL (SEQ ID n° 87)	69,9		

Tableau III : Analyse épitopique, à l'aide de la technique spot, de l'antisérum de la souris 12.

N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité	N° spot	séquence peptidique du spot détecté
1	HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	177,0	38	LEPLQESPRPTGVWK (SEQ ID n° 88)
2	PLGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 70)	170,0	39	EPLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 89)
3	LGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 71)	145,7	40	PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 90)
4	GSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 24)	166,3	41	LQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 91)
5	SPGSASDLETSG (SEQ ID n° 72)	185,0	42	QESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 92)
6	PGSASDLETSG (SEQ ID n° 73)	169,3	43	ESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 93)
7	GSASDLETSG (SEQ ID n° 25)	155,2	44	ESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 93)
8	SASDLETSG (SEQ ID n° 74)	176,5	45	SPRPTGVWKS (SEQ ID n° 94)
9	ASDLETSG (SEQ ID n° 75)	108,0	46	PRPTGVWKS (SEQ ID n° 95)
10	SDLETSG (SEQ ID n° 76)	118,3	47	RPTGVWKS (SEQ ID n° 16)
11	DLETSG (SEQ ID n° 77)	121,0	48	PTGVWKS (SEQ ID n° 96)
12	LETSG (SEQ ID n° 78)	101,0	49	TGVWKS (SEQ ID n° 97)
17	LQEQRNHLQGK (SEQ ID n° 79)	99,0	61	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 98)
18	QEQRNHLQGK (SEQ ID n° 80)	179,8	62	RGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 99)
19	EQRNHLQGK (SEQ ID n° 29)	189,6	63	GHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 100)
20	QRNHLQGK (SEQ ID n° 81)	211,8	64	HRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 53)
21	RNHLQGK (SEQ ID n° 82)	219,0	65	RKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 101)
22	NHLQGK (SEQ ID n° 30)	213,3	66	KMVLYTLRAP (SEQ ID n° 102)
23	HLQGK (SEQ ID n° 83)	202,6	67	MVLYTLRAP (SEQ ID n° 45)
24	LQGK (SEQ ID n° 84)	189,5	68	VLYTLRAP (SEQ ID n° 103)
25	QGK (SEQ ID n° 85)	187,3		
26	GK (SEQ ID n° 86)	36,6		
27	KL (SEQ ID n° 87)	69,9		

Exemple 9 : Obtention d'anticorps monoclonaux reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108)

5 Trois jours avant la réalisation de la fusion lymphocytaire, la souris 12 a subi une hyper-immunisation selon le protocole suivant : la dose totale d'immunogène, ici 100µg de proBNP(1-108) en tampon PBS stérile, est fractionnée en 4 injections. La première et la seconde injections correspondent
10 chacune à 1/10ème de la dose totale. Ces injections sont réalisées par voie sous-cutanée en différents endroits et à 45 minutes d'intervalle. La troisième injection qui correspond aux 2/10èmes de la dose totale est réalisée, 45 minutes après la seconde injection, par voie sous-cutanée. Trente minutes après la troisième injection, une injection par voie intrapéritonéale de 100µl d'une solution de prométhazine à 1mg/ml en PBS stérile (Phénergan à 2,5%,
15 Laboratoires Medeva Parma) est réalisée afin de prévenir tout choc anaphylactique. Enfin ~~15 minutes après, la dernière injection correspondant~~
aux 6/10èmes de la dose totale est effectuée par voie intrapéritonéale.

 L'hybridation lymphocytaire est réalisée selon la méthode décrite par Koehler et Milstein (Nature, 1975; 256:495-97). Elle est réalisée à partir
20 des cellules lymphocytaires extraites de la rate de la souris et des cellules myélomateuses (P3-X63-Ag8.653) préalablement mises en culture en milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker #BE12-167F), complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma #G-6784), additionné de 10% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker
25 #BE02701E) et de 8-azaguanine (Sigma #A-8526). Les cellules lymphocytaires et les cellules myélomateuses, préalablement placées en milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker #BE12-167F) complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma #G-6784) sans addition de sérum de veau fœtal, sont mélangées à raison de 5 cellules lymphocytaires pour 1 cellule
30 myélomateuse. Après centrifugation du mélange 7 minutes à 900 tr/mn à température ambiante, et remise en suspension du culot cellulaire, 1ml de polyéthylène glycol Hybri-Max® (Sigma #P-7777) est ajouté. Après 1 minute d'incubation au bain marie à 37°C, les cellules sont centrifugées pendant 1

minute et trente secondes à 1000 tr/mn à température ambiante. Enfin après incubation de 2 minutes au bain marie à 37°C, le culot est remis en suspension et 6 ml de milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker #BE12-167F) complétementé avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma #G-6784) préalablement placé à 37°C, sont ajoutés à raison de 100µl toutes les 5 secondes, et 9ml de ce même milieu sont ajoutés en une fois. Après centrifugation pendant 10 minutes à 900 tr/mn à TA, et élimination du surnageant, le culot est repris par du milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker #BE12-167F), complétementé avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma #G-6784), additionné de 15% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker #BE02701E) et de HAT (Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine Sigma #H-0262), de façon à distribuer, sous 100µl, 120 000 cellules par puits. La solution est déposée sous 100µl dans les puits des plaques de culture à 96 puits préalablementensemencés de macrophages murins. Les plaques sont ensuite placées dans un incubateur à CO₂. Quinze jours après l'hybridation lymphocytaire, le nombre de clones présents dans les plaques de fusion est estimé et exprimé en pourcentage de développement des hybridomes. La sélection de hybridomes est effectuée en ELISA sur proBNP(1-108) et peptide comprenant la séquence RAPR₇₆S₇₇P. Les hybridomes sélectionnés sont maintenus en culture et clonés en dilution limite. Les hybridomes ainsi clonés peuvent ensuite être utilisés pour la production de l'anticorps monoclonal en liquide d'ascite.

Exemple 10 : dosage radioimmunométrique du proBNP(1-108)

Matériels :

1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat et puits sécables, Nunc (Danemark).

2) L'anticorps de capture utilisé est l'anticorps polyclonal obtenu à partir du sérum du lapin #046 805 non épuisé.

3) Le conjugué utilisé est un anticorps anti-BNP(77-108) marqué à l'I¹²⁵ (anti-BNP-I¹²⁵). Il s'agit de l'anticorps traceur du kit BNP Shionoria commercialisé par la société Shionogi.

4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma #A-7888)

5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de tween 20 (Sigma, #P-1379).

5 4) Tampon de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de tween 20.

5) Etalon proBNP(1-108): produit sous forme de protéine recombinée.

10

Protocole :

Le principe du test utilisé est basé sur la méthode radioimmunologique de type sandwich , réalisé en microplaque à fond plat et à cupules sécables. Il s'agit d'un test en un temps où échantillon (ou solution étalon de proBNP(1-108)) et traceur sont ajoutés l'un après l'autre sans lavage intermédiaire.

15

✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 40µg/ml. 300µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaque.

20

✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 300µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

25

✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage (tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 additionné de Tween 20 à 0,1%).

✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.

30

✓ 200µl de la solution de traceur anti-BNP-I¹²⁵ prête à l'emploi (extraite du kit BNP Shionoria de Shionogi) sont ajoutés dans chacun des puits.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant une nuit (18-22h) à 4°C.

✓ Le lendemain, la microplaque est lavée (3 fois) à l'aide de 300µl de la solution de lavage. Au dernier lavage et après aspiration de la solution de lavage, chaque cupule est transférée dans un tube préalablement identifié.

✓ La radioactivité présente dans chaque cupule est proportionnelle à la quantité de traceur fixée, donc à la quantité de proBNP(1-108) présente dans l'échantillon, est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

La figure 7 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

Exemple 11 : résultats du dosage d'échantillons humains

A l'aide du dosage IRMA proBNP(1-108) décrit dans l'exemple 10, 6 prélèvements de sujets sains et 7 prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont été testés. Les échantillons sanguins ont tous été prélevés sur tube contenant de l'EDTA. La figure 8 présente les résultats en cpm (coups par minute) de ces dosages d'échantillons. Les résultats obtenus sur les prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont significativement plus élevés que ceux obtenus sur les prélèvements de sujets sains. Ces résultats mettent en évidence la présence de proBNP(1-108) circulant dans les prélèvements de patients souffrants d'insuffisance cardiaque et constituent la première démonstration que le proBNP(1-108) sérique est un marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque.

Exemple 12 : couplage de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 à la biotine

La méthode de couplage utilise un dérivé N-Hydroxy Succinimide (NHS) de la biotine qui réagit avec les amines primaires des IgG pour former une liaison amide.

Une solution de (+)-Biotine N-succinimidyl ester (Fluka #14405) à 100mM est préparée par dissolution de la Biotine dans de la

diméthylformamide. La biotinylation est réalisée dans un flacon en verre. 500 µg de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 préalablement purifié mais non épuisé sont déposés dans le flacon avec 17 µl de la solution de biotine 100mM (le rapport molaire biotine/anticorps est de 500). La réaction se fait en tampon
 5 PBS Dulbecco à pH 7,4. Le mélange réactionnel est incubé 1 heure 30 à température ambiante sous agitation lente. Après couplage, la biotine est inactivée par ajout d'un volume de tampon glycine 2M. Le mélange est mis à incuber pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation lente. Enfin le mélange est mis à dialyser une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco
 10 à pH 7,4. Le lendemain, une solution d'azoture de sodium est ajoutée à 0,02% en concentration finale. Le conjugué est conservé à 4°C.

Exemple 13 : Dosage immunoenzymométrique du proBNP(1-108)

15 Un dosage immunoenzymométrique a également été mis au point.

Matériels :

- 1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat, Nunc (Danemark).
- 2) L'anticorps de capture utilisé est un anticorps polyclonal anti-
 20 BNP(77-108) commercialisé par la société Strategic Biosolution (#B9105RA00-A0).
- 3) Le conjugué utilisé est l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé couplé à la biotine selon le procédé décrit dans l'exemple 12.
- 4) Conjugué streptavidine-peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech
 25 #RPN1231V)
- 5) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma #A-7888)
- 6) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0.1% de BSA et 0,1% de Tween 20.
- 30 7) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.
- 8) Etalon proBNP(1-108) : protéine recombinée.
- 9) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :

9a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l' H_2O_2 à 0,33%, de pH final 5,6, et

9b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.

5 10) Solution d'arrêt : H_2SO_4 4N.

Protocole :

10 Le principe du test utilisé est basé sur la méthode enzymoimmunologique de type sandwich, réalisé en microplaque à fond plat. Il s'agit d'un test en deux temps où l'échantillon (ou la solution étalon) est tout d'abord mis à incuber avec l'anticorps de capture, puis après incubation et lavages, l'anticorps de détection est ajouté.

15 ✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 10µg/ml. 100µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaque.

✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

20 ✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

25 ✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage.

✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.

30 ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante

✓ La microplaque est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.

✓ Le conjugué, l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 couplé à la

biotine est ajouté dans les puits de la microplaque à 6µg/ml sous 100µl.

✓ Le milieu réactionnel mis à incuber pendant 2 heures à température ambiante.

5 ✓ La microplaque est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.

✓ Enfin 100µl de conjugué streptavidine-POD dilué au 1/1000ème sont ajoutés dans chacun des puits de la microplaque.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant 1 heure 30 à température ambiante.

10 ✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).

15 ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.

✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

20 La figure 8 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

25 **Exemple 14 : Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), du dosage ELISA proBNP(1-108) combinant l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) avec l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé couplé à la biotine.**

30 A l'aide du dosage ELISA proBNP(1-108) décrit dans l'exemple 13, on a évalué la réaction croisée du dosage vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108). Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA ProBNP(1-108) décrit dans l'exemple 13. Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 9 pour chacune des protéines.

Aucune réaction croisée n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108) : le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml pour les concentrations les plus élevées), l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisé sans entraîner l'apparition de réaction croisée.

Exemple 15 : Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), du dosage ELISA proBNP(1-108) combinant un anticorps polyclonal anti-BNP(1-76) avec l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé couplé à la biotine.

A l'aide d'un dosage ELISA utilisant le protocole et les réactifs décrits dans l'exemple 13, mis à part que l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) est ici remplacé par un anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29), on a évalué la réaction croisée de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 non épuisé biotinylé combiné cette fois avec un polyclonal anti-BNP(1-76). L'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29) a été produit selon le protocole décrit dans l'exemple 3, mis à part que le peptide utilisé comme immunogène était le peptide NT-proBNP(1-29) couplé à la KLH. Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA ProBNP(1-108). Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 10 pour chacune des protéines. Aucune réaction croisée n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108), le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml), l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisé sans entraîner l'apparition d'une réaction croisée.

REVENDEICATIONS

1. Peptide de formule :

5 $a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2$ (I)

où

a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

15 a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoxyle.

2. Peptide de formule :

$\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}\text{-Z}$ (II)

20 où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

25 3. Peptide selon la revendication 2, ayant la séquence $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}$.

4. Peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

30 $\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}\text{-Z}$ (II) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

REVENDICATIONS

5 1. Anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique le peptide $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas les peptides BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

10 2. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 1 qui reconnaît de façon spécifique le peptide $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}$ du proBNP(1-108).

15 3. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108), tels que définis à l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108)

puis on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

20 4. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) tels que définis à l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2$ (I)

25 où

a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

5. Peptide selon la revendication 1, ayant une séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences suivantes

	SEQ ID N° 6 :	C-G-R-A-P-R-S-P
5	SEQ ID N° 7 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P
	SEQ ID N° 8 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 9 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 10 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V
	SEQ ID N° 11 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
10	SEQ ID N° 12 :	R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 13 :	Acetyl -R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 14 :	Acetyl -C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 17 :	C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 18 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
15	SEQ ID N° 19 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA
	SEQ ID N° 20 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
	SEQ ID N° 21 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
	SEQ ID N° 22 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A

20 6. Peptide ayant la séquence C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
(SEQ ID N° 15)

7. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide
25 RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108), puis on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du
30 peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

8. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

5 a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle ;
- un peptide de formule

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z
10 peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II) par substitution d'un ou
15 plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ; et

20 - le peptide ayant la séquence C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K (SEQ ID n° 15) ;

et, éventuellement, on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

25 5. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108), tels que définis à la revendication 1 ou 2 dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

$a_1 - X_1 - RAPRSP - X_2 - a_2$ (I)

où

RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec un peptide tel que

5 défini dans l'une des revendications 1 à 6,

et, éventuellement, on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

9. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti

10 proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ et/ou le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on

15 immunise un animal avec un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 6,

on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal,

et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de

20 myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

10. Anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique le peptide RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas les peptides BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et,

25 d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

11. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 10 qui reconnaît de façon spécifique le peptide Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ du

30 proBNP(1-108).

12. Anticorps selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 7 et 8.

a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

5 X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

10 a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoxy ;
- un peptide de formule

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ; et

15 - un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

20 - le peptide ayant la séquence C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K (SEQ ID n° 15) ;

25 on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal,

et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

30 6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, dans lequel le

13. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon la revendication 9.

5 14. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 13.

10 15. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) du proBNP(1-108) tel que défini dans l'une des revendications 10 à 12 et 14 et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

15 16. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 10 à 12 et 14,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

20 c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

25

17. Méthode de diagnostic selon la revendication 16 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

30 18. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 10 à 12 et 14.

peptide de formule (II) a la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, dans lequel le peptide de formule (I) a une séquence

5	SEQ ID N° 6 :	C-G-R-A-P-R-S-P
	SEQ ID N° 7 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P
	SEQ ID N° 8 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 9:	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 10:	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V
10	SEQ ID N° 11 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 12 :	R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 13 :	Acetyl -R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 14 :	Acetyl -C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 17 :	C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
15	SEQ ID N° 18 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 19 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA
	SEQ ID N° 20 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
	SEQ ID N° 21 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
20	SEQ ID N° 22 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A

8. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon la revendication 5.

25 9. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 8.

30 10. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini dans l'une des revendications 1, 2 ou 9 et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

19. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant, comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 6.

5 20. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 10 à 12 et 14;

10 - dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 6.

11. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

- 5 a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 1, 2 ou 9,
- b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et
- c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés,
- 10 éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

12. Méthode de diagnostic selon la revendication 11 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

13. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2 ou 9.

14. Trousse de détection selon la revendication 13 du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant :

(i) dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2 ou 9;

(ii) dans un autre récipient au moins un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2$ (I)

où

a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

5 X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

10 a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle ;
- un peptide de formule

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z
~~peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas~~
15 à la séquence du proBNP(1-108) ;

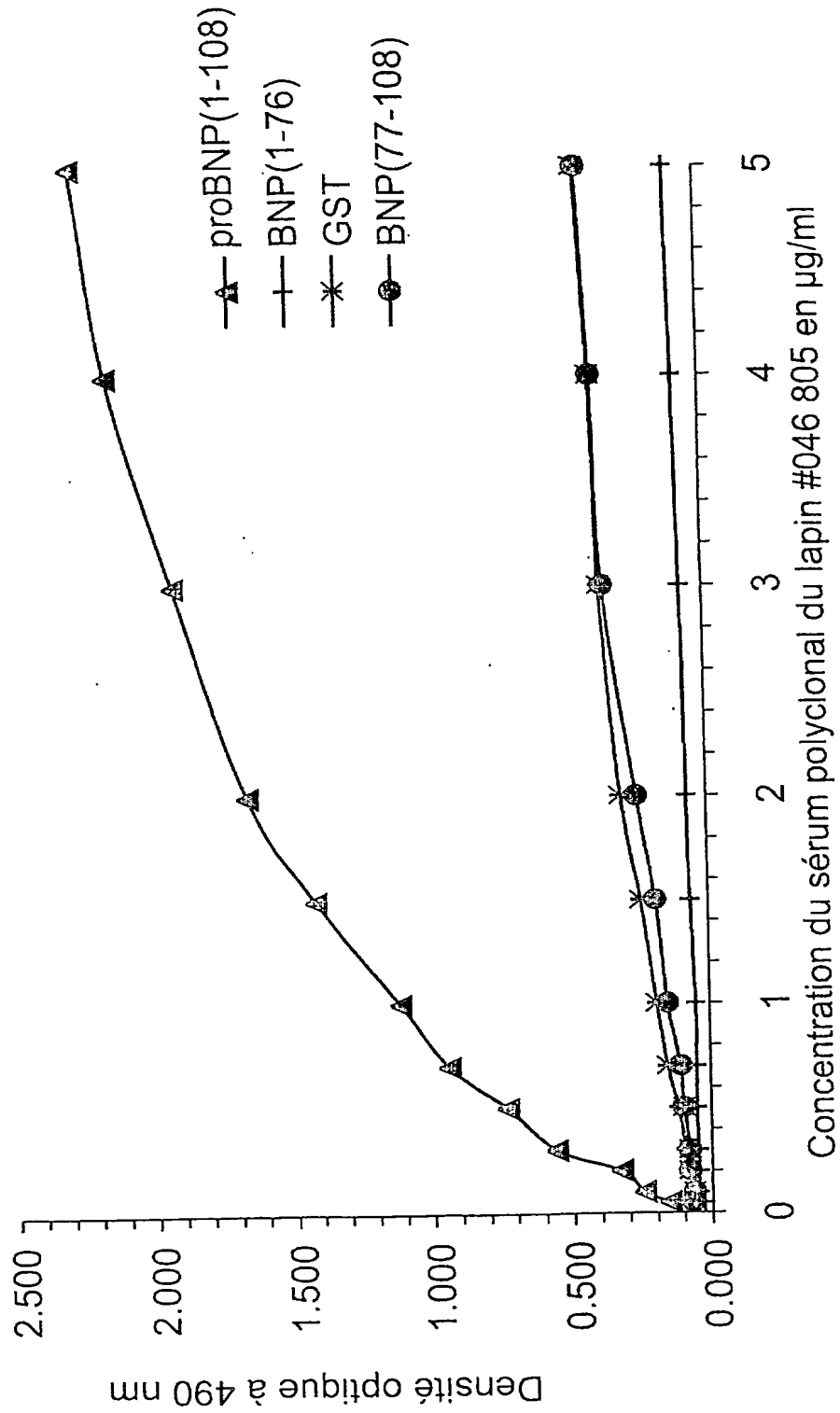
- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

20 $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}-Z$ (II) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ; et

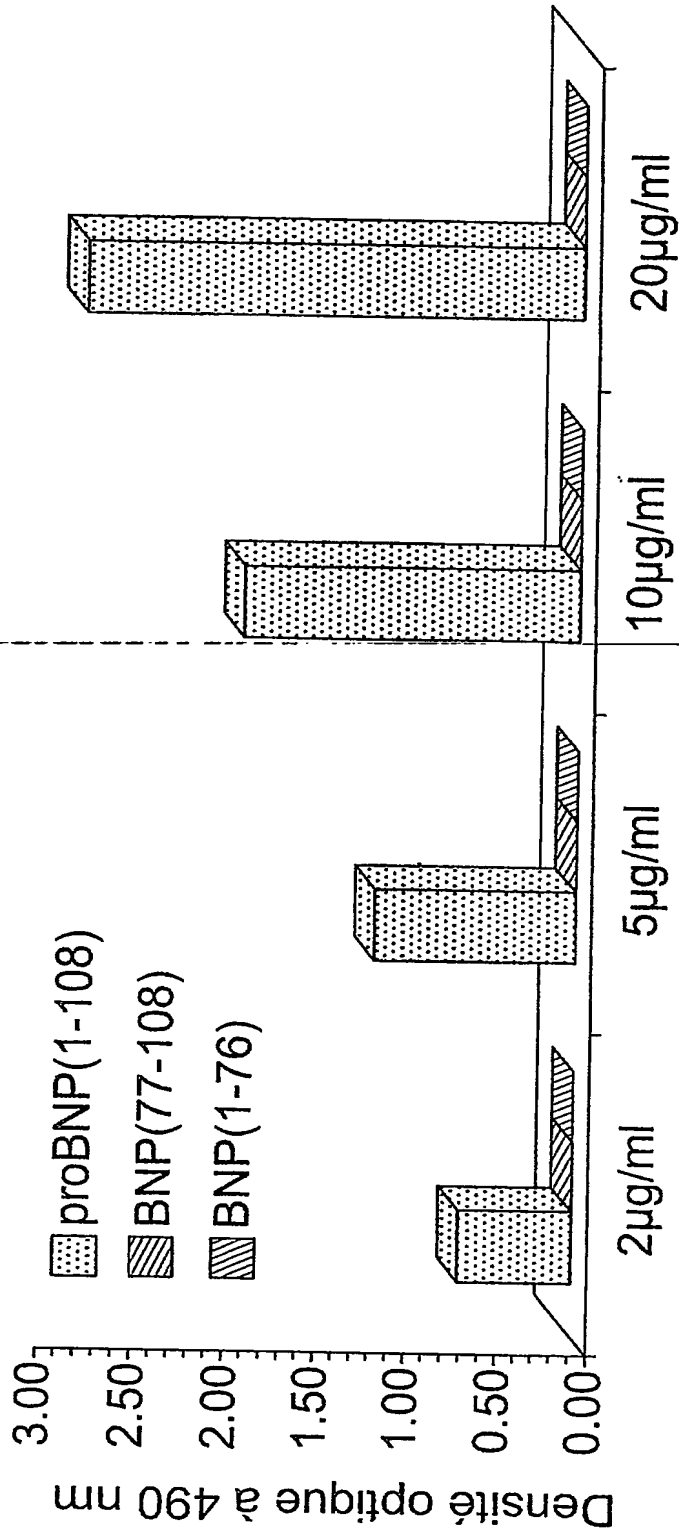
- le peptide ayant la séquence C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K (SEQ ID n° 15).

25

1/10

FIG.1

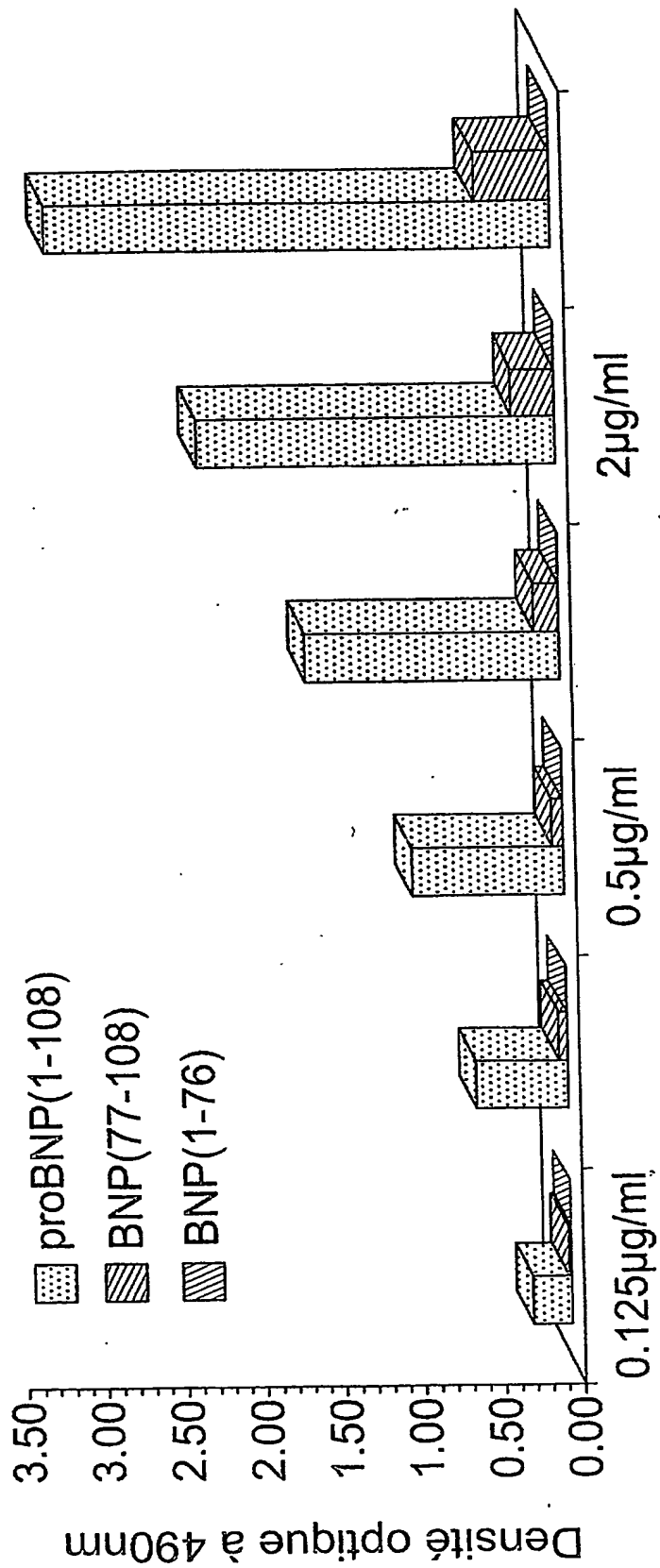
2/10



Filtrat du sérum polyclonal du lapin #046 805 (µg/ml)

FIG.2

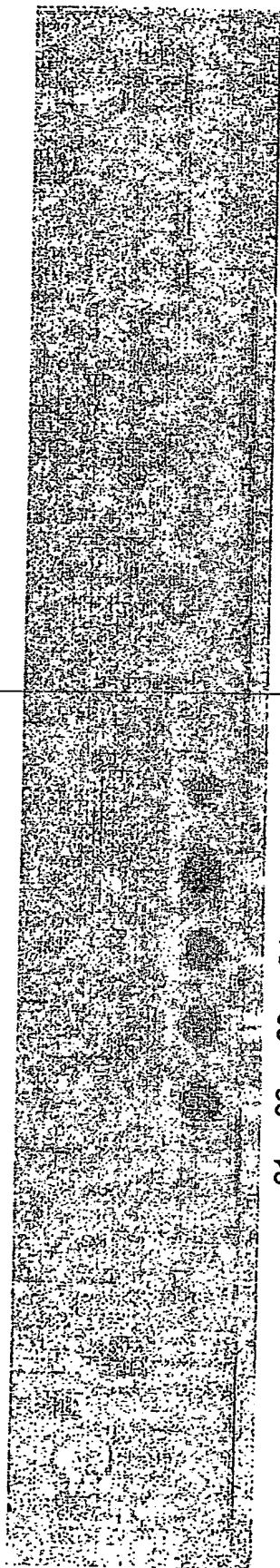
3/10



Eluat du sérum polyclonal du lapin #046 805 (µg/ml)

FIG.3

4/10



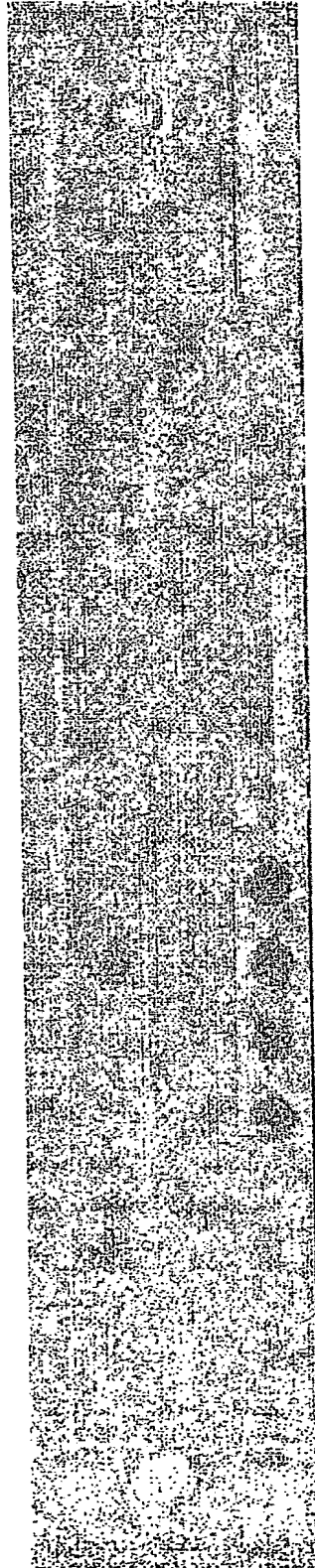
21	IRGHRK	MVLYTLRAP	21	22	23	24	25	26	27
22	HRKM	VLYTLRAP	RSP						
23		MVLYTLRAP	RSP	KMV					
24		YTLRAP	RSP	KMV	QGS				
25		RAP	RSP	KMV	QSGCF				
26			RSP	KMV	QSGCF	GRK	84,5		
27				KMV	QSGCF	GRK	MDR	33,0	

Réactivité (en unités relatives d'intensité) :

32,8
104,8
99,2
117,5
119,0
84,5
33,0

Spots détectés

FIG.4



21 22 23 24 25 26

Réactivité (en unités relatives d'intensité) :

21	IRGHRK	MVLYTLRAP	32,0	} Spots détectés
22	HRKMVLYTLRAP	RSP	125,9	
23	MVLYTLRAP	RSPK	104,2	
24	YTLRAP	RSPK	121,1	
25	RAPRSP	KMVQGS	113,7	
26	RSPK	MVQSGGCFGRK	35,0	

FIG.5

6/10

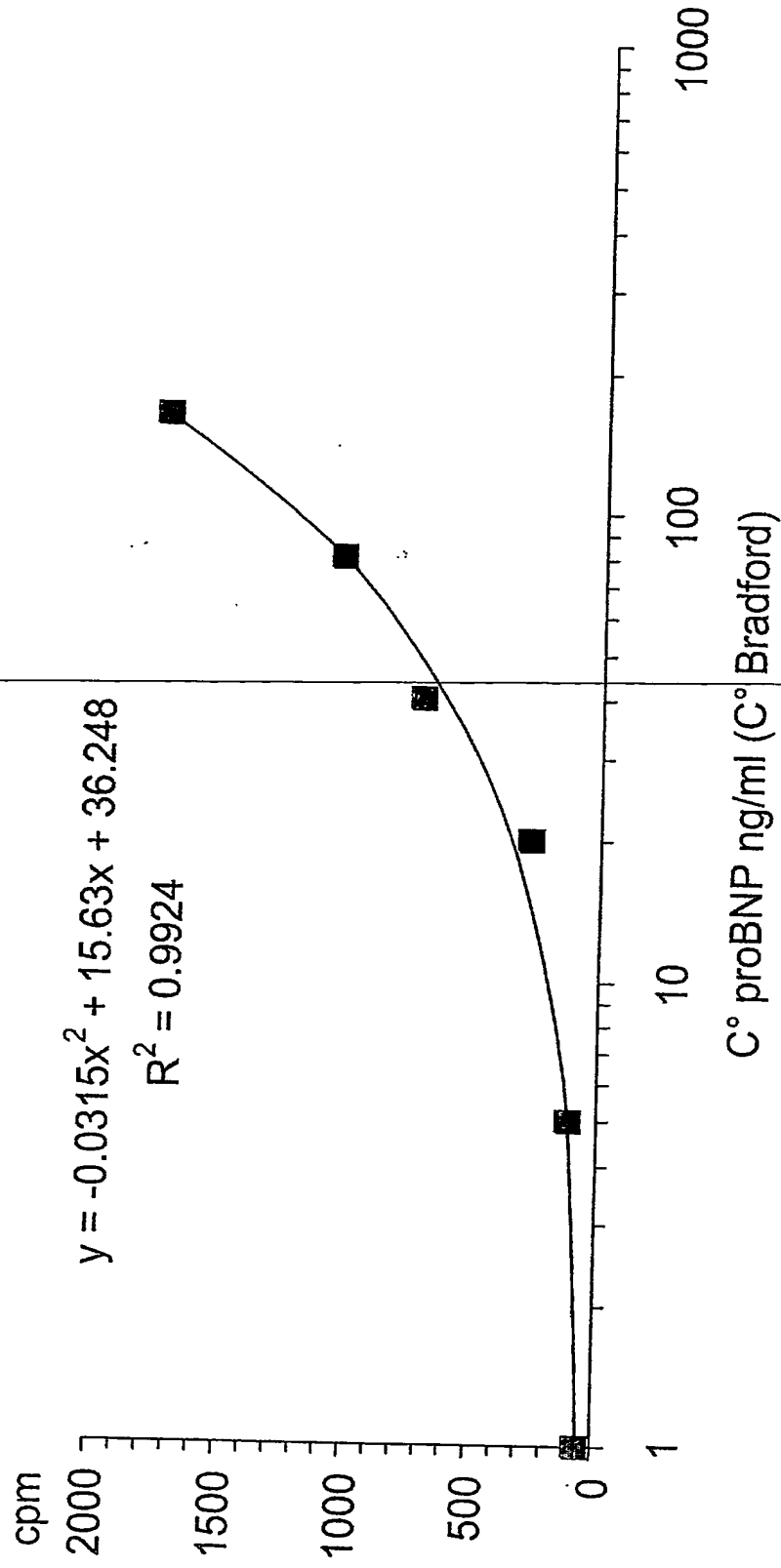
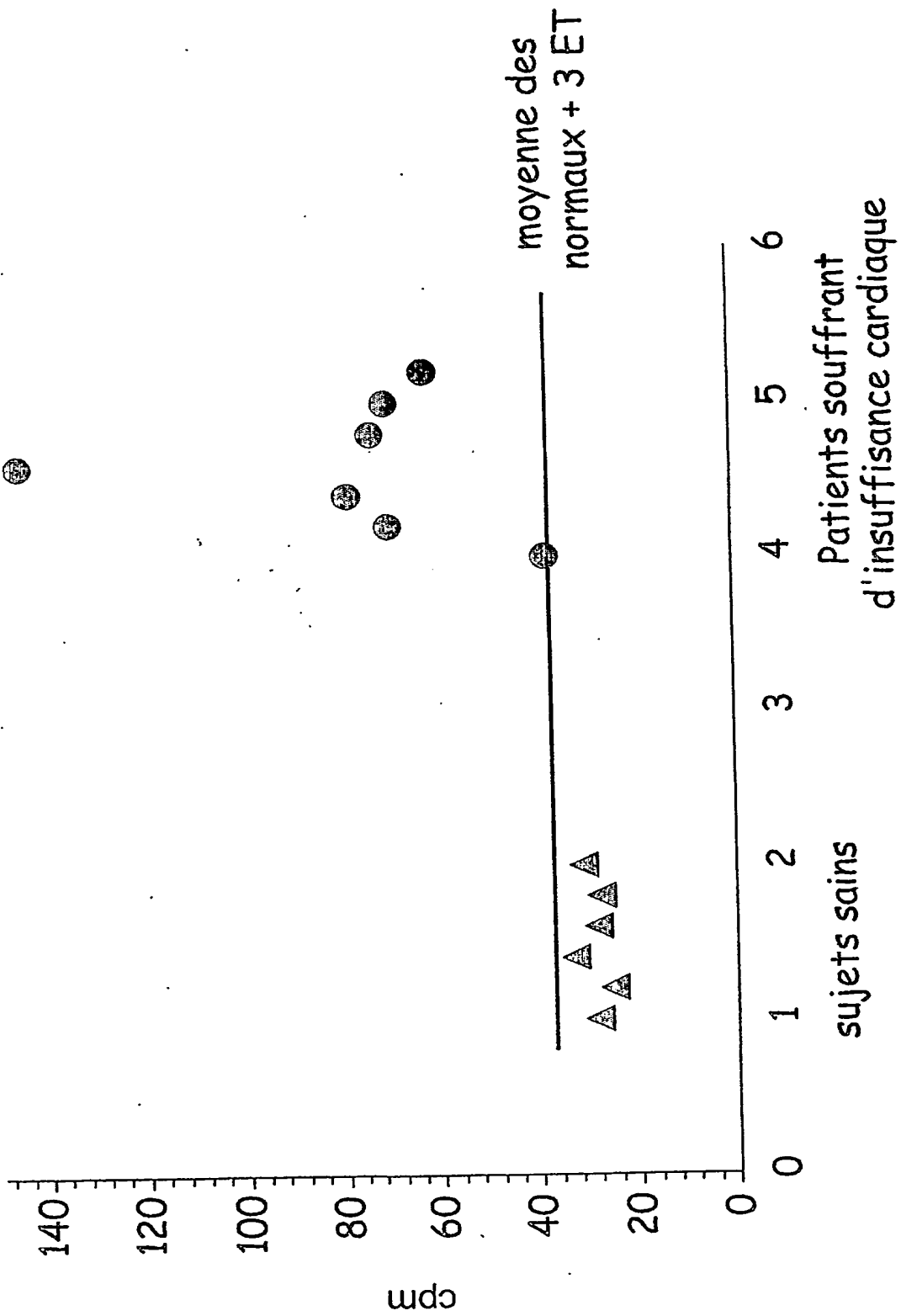


FIG.6

7/10

FIG.7

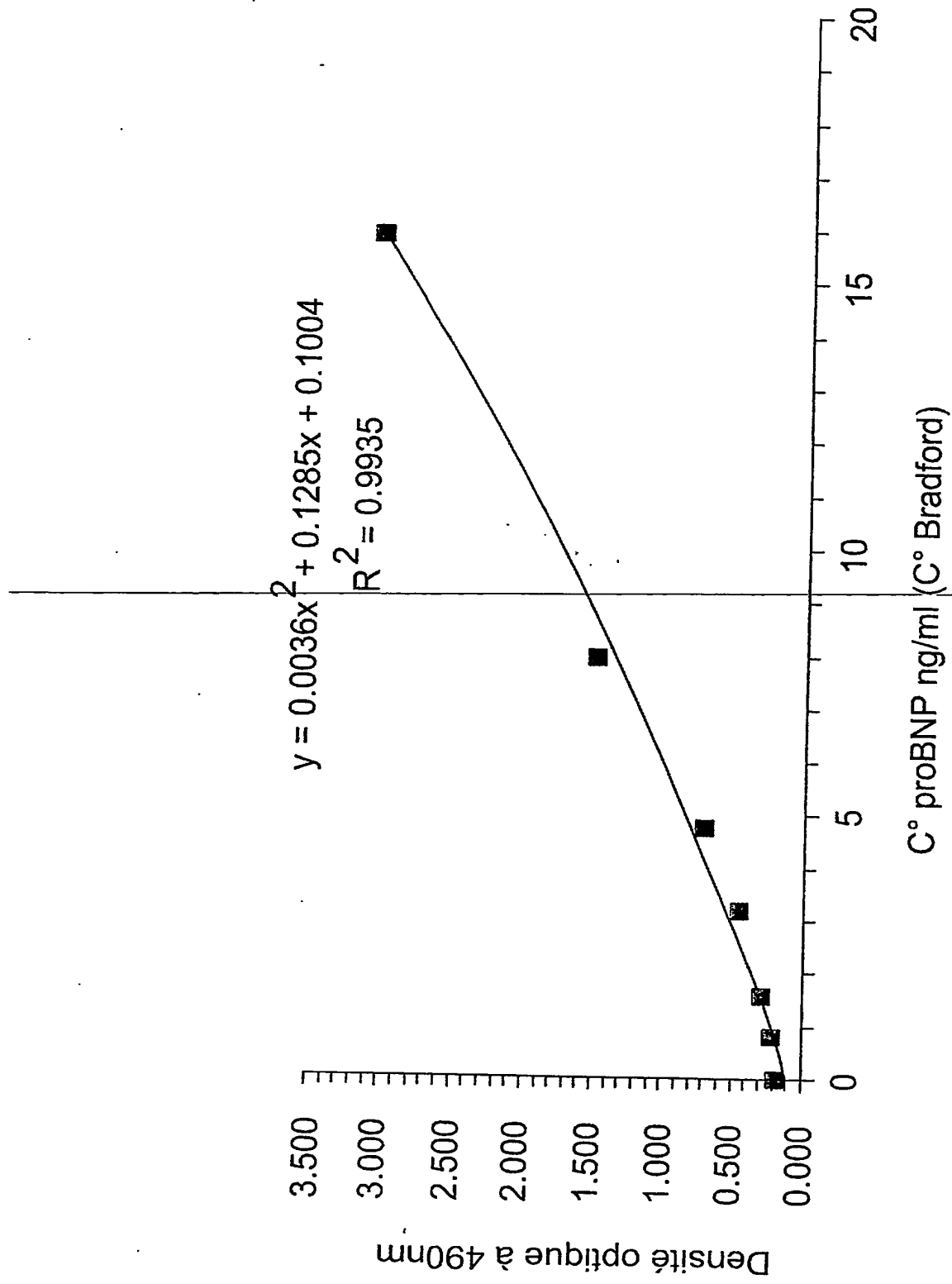
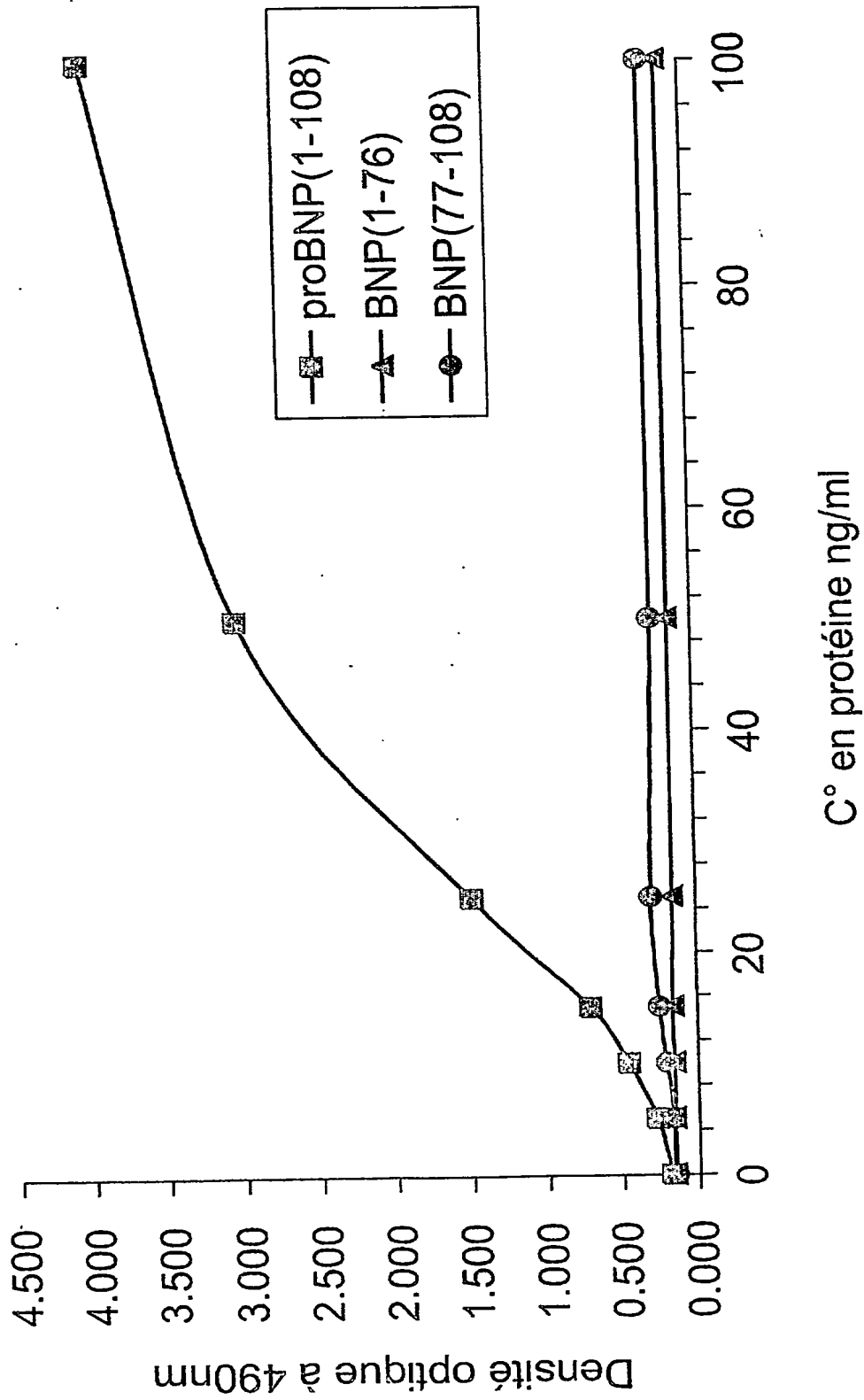


FIG.8

9/10

FIG.9

10/10

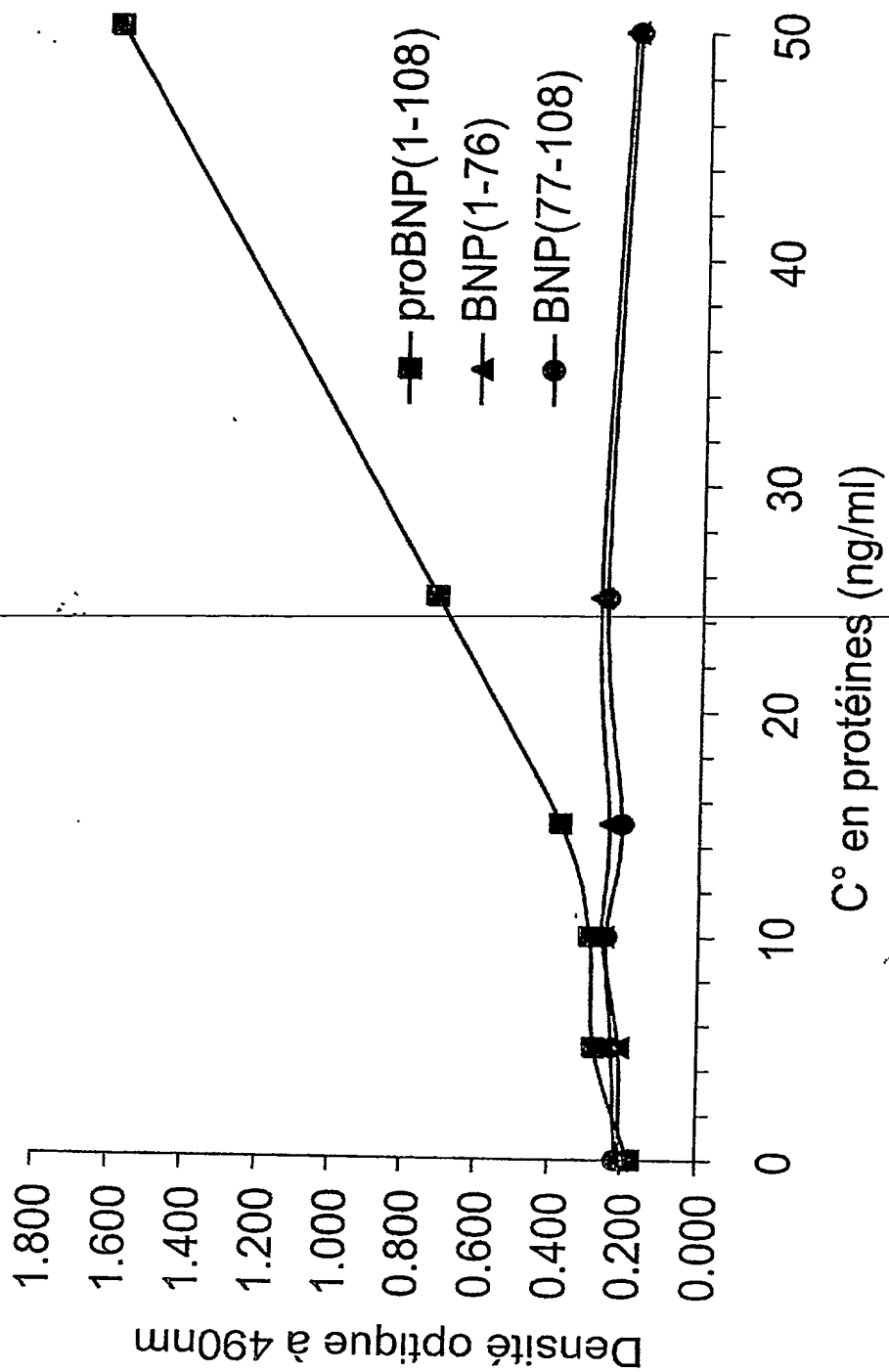


FIG.10

SEQUENCE LISTING

<110> Bio-Rad Pasteur

CNRS

Université de Montpellier

<120> Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance
cardiaque

<130> BFF 02/0329

<140> FR 02/10063

<141> 2002-08-07

<160> 104

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(1-108)

<400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
65 70 75 80

Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
100 105

<210> 2
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens : proBNP(77-108)

<400> 2

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
20 25 30

<210> 3
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens : proBNP(1-76)

<400> 3

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
 35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
 50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
 65 70 75

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : proBNP(70-85)

<400> 4

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : proBNP(73-78)

<400> 5

Arg Ala Pro Arg Ser Pro
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 6

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

<400> 7

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 8

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<400> 9

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 10

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val
1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 11

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 12

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys
1 5

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<400> 13

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys
 1 5

<210> 14
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<400> 14

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
 1 5 10

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 15

Cys His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro
 1 5 10 15

Lys

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 16

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 17

Cys Phe Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 18

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 19

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 20

Cys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Ala	Thr
1				5				10					15		

Ala

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 21

Cys	Phe	Ser	Ile	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Ala	Thr
1				5				10					15		

Ala

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 22

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Leu Ala Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Ala

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide
 <400> 23

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide
 <400> 24

Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide
 <400> 25

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 26

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 27

Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 28

Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 29

Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 30

Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 31

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 32

Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 33

Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 34

Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 35

Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 36

Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 37

Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 38

Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 39

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 40

Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 41

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 42

Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 43

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 44

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro
 1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 45

Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val
 1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 46

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 47

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe
 1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 48

Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys
1				5					10					15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 49

Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg
1				5					10					15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 50

Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 51

Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly
1					5					10				15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 52

Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys
1				5						10				15

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 53

Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu
1				5					10					15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 54

Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	His
1				5					10					15

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 55

Ala Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser

1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 56

Tyr Ala Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 57

Tyr Thr Ala Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 58

Tyr Thr Leu Ala Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 59

Tyr	Thr	Leu	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 60

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Ala	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 61

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 62

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 63

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 64

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 65

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Ala	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 66

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Ala	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 67

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Ala	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 68

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Ala	Ser
1				5					10					15

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 69

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 70

Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 71

Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 72

Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 73

Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 74

Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn
1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 75

Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His
1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 76

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu
1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 77

Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 78

Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly
1				5					10					15

<210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 79

Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu
1				5					10					15

<210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 80

Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln
1				5					10					15

<210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 81

Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu
1				5					10					15

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 82

Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln
1				5					10					15

<210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 83

His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser
1				5					10					15

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 84

Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu
1				5					10					15

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 85

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu
1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 86

Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro
1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 87

Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu
1 5 10 15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 88

Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys
1 5 10 15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 89

Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser
1				5					10				15	

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 90

Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg
1				5					10				15	

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 91

Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu
1				5					10				15	

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 92

Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val
1				5					10				15	

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 93

Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala
1				5					10				15	

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 94

Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala	Thr
1				5					10				15	

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 95

Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Glu
1				5					10				15	

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 96

Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile

1 5 10 15

<210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 97

Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg
 1 5 10 15

<210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 98

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

 <400> 99

Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle : peptide

<400> 100

Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 101

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 102

Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
 1 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 103

Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln
 1 5 10 15

<210> 104

<211> 35

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 104

Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp
1				5					10					15	

Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	His
				20				25					30		

Lys	Lys	Lys
		35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.